

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 C08L 79/02, A61K 45/00, 48/00, 47/48 // C12N 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/43752</p> <p>(43) 国際公開日 1999年9月2日(02.09.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/09954</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月26日(26.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/48187 1998年2月27日(27.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)[JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 奥 直人(OKU, Naoto)[JP/JP] 〒424-0857 静岡県清水市川原町21-11 教職員住宅302号 Shizuoka, (JP) 南後 守(NANGO, Mamoru)[JP/JP] 〒466-0827 愛知県名古屋市昭和区川名山町128-4 枳中住宅1-11 Aichi, (JP) 宮崎秀樹(MIYAZAKI, Hideki)[JP/JP] 榊原裕幸(SAKAKIBARA, Hiroyuki)[JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: COMPOSITIONS FOR TRANSPORTING NEGATIVELY CHARGED SUBSTANCES</p> <p>(54)発明の名称 負電荷物質を輸送するための組成物</p> <p>(57) Abstract Novel transport carriers comprising polyalkylimines having two or more hydrophobic groups transferred thereinto. It is found out that use of these carriers makes it possible to transfer genes into cells at a high transfer efficiency.</p>		

複数の疎水基を導入したポリアルキルイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で細胞内に遺伝子を導入することができることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NL	オランダ	VN	ヴィエトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CJ	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

### 負電荷物質を輸送するための組成物

#### 技術分野

本発明は、負電荷物質を細胞内へ輸送するための組成物に関する。

#### 背景技術

薬物治療において、薬物を目的とする細胞又は細胞内組織に到達させるシステム、すなわちドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; 以下単に「DDS」と称する) は重要な技術である。遺伝子治療においても、DDS を利用して遺伝子を所望の細胞に導入することが中心的な技術であることは言うまでもない。細胞内に遺伝子を導入するための方法は大きく二つに分類することができる。

一つは、ウイルスベクターを用いる方法である。これには、所望の外來性遺伝子をゲノム上に有するウイルスを感染させることにより、内部の核酸を細胞内に導入するという方法が含まれる。もう一つは、人工的なまたは半人工的な輸送担体 (キャリアー) に、所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを封入または担持させる方法である。この方法は、目的物の生体内挙動および輸送に関与する諸過程を、キャリアー自体の物理化学的性質に依存させることにより、生理活性物質を所望の臓器 (標的臓器)、細胞 (標的細胞) または細胞内器官 (標的器官) に到達せしめることを特徴とする。この方法におけるキャリアーとしては例えば、リボソーム (F. Ledley et al., Human Gene Therapy 6, 1129-1144 (1995))、タンパク質 (Human Gene Therapy 5, 429 (1994))、ペプチド (Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America 90, 893

(1993))、合成高分子化合物 (Tang et al., Human Gene Therapy 4, 823-832 (1997))、および (再構成) センダイウイルス (Exp. Cell Res. 159, 399 (1985))などを例示することができる。

キャリアとしてリボソームを用いる方法には、様々な工夫が施されてきた。近年、DNA分子がポリアニオンであることに着目し、DNA分子と静電的に親和性を有し、容易に複合体を形成できるカチオン性脂質をリボソームとして用い、標的細胞に該DNA分子を導入する試みがなされている。このようなカチオン性脂質としては、リボフェクチン、1、2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン (DOTAP)、1、2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE) (F. Ledley et al., Human Gene Therapy 6, 1129-1144 (1995))、トランスフェクタム等が知られている。しかしながら、カチオン性脂質はエンドサイトーシス過程を経て細胞内に取り込まれるとリソソーム等により分解されやすく、遺伝子の導入効率が低いという問題があった。

これらの問題を解決するために、カチオン性高分子を用いる試みもなされている。例えば、Kim らはポリリジンに疎水基を結合させ、これを疎水性相互作用により血漿タンパク質へ導入後、DNA分子と静電的に結合させる遺伝子導入システムを開示している (米国特許第 5,679,559 号)。また、Zhou らは疎水基を導入したポリリジンとリン脂質からなるリボソームを調製した (X. Zhou et al., Biochimica et Biophysica Acta. 1065, 8-14 (1991), X. Zhou et al., ibid. 1189, 195-203 (1994))。Zhou らのリボソームは、ポリ-L-リジンを用いることにより細胞傷害性を低減させ、脂質残基を導入することにより標的細胞へのDNA/リボソーム複合体の親和性を向上させることに成功した。しかしながら、細胞へ効率良く導入するためには、細胞を予め化学物質

で処理することが必要であった。また、国際公開第 97/45442 号パンフレットにおいては、コレステロール基を導入したポリアミンを含むリボソームを開示している。

その他のカチオン性高分子として、ポリアルキレンイミン、特にポリエチレンイミン (PEI) が知られている (N. Oku et al., J. Biochem. 100, 935-944 (1986), N. Oku et al., Biochemistry 26, 8145-8150 (1987), Suh et al., Bioorganic Chem. 22, 318-327 (1994))。ポリエチレンイミンは直鎖または分岐型のポリマー分子であり、その分子中にプロトン化したアミノ基を有し、これを介して DNA 分子と結合することができ、また、細胞標的物質または細胞膜変性剤を用いる必要がないことから、遺伝子導入において応用されている (W096/02655, O. Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-7301 (1995), B. Abdallah et al., Hum. Gene Ther. 7, 1947-1954 (1996), Lambert et al., Mol. Cell Neurosci. 7, 239-246 (1996), R. Kircheis et al., Gene Ther. 4, 409-418 (1997), A. Baker et al., Gene Ther. 4, 773-782 (1997), A. Baker et al., Nucleic Acids Res. 25, 1950-1956 (1997), Durmort et al., Gene Ther. 4, 808-814 (1997), Tang et al., Gene Ther. 4, 823-832 (1997), A. Boletta et al., Hum. Gene Ther. 8, 1243-1251 (1997), Ferrari et al., Gene Ther. 4, 1100-1106 (1997))。ポリエチレンイミンの細胞内導入機構について、Demeneix らによる仮説が報告されている (Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery, ed. by P. L. Felgner et al., p. 146-151, ACS conference proceeding series, 1996)。

一方、遺伝子導入能を示すカチオン性リボソーム (またはリボプレックス) 構成脂質において極性基にスベルミン構造を有する化合物には、先に述べたトランスフェクタム (J.-P. Behr et al., Proceedings of National Academy of Science of United States of America 86, 6982

(1989)、あるいは DOGS [PROMEGA] )、リボフェクタミン ( [Gibco BRL]、あるいは DOSPA、P. H-Nelson et al., FOCUS 15、 73 (1993) )、セルフェクチン ( [Gibco BRL]、あるいは TM-TPS、Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery, ed. by P. L. Felgner et al., p.169-176, ACS Conference Proceeding Series, 1996)、GL67 (あるいは #67) 類縁化合物 (E.R.Lee et al., Human Gene Therapy 7, 1701 (1995))、RPR 120535 関連化合物 (W097/18185、G. Byk et al., Tetrahedron Lett., 38, 3219 (1997)) などが知られている。

しかしながら、疎水基を導入したポリエチレンイミンまたは分子量分布を有しないポリエチレンイミン関連構造類縁体を遺伝子導入のための担体として用いた報告例はない。またスベルミンを多分子連結した部分構造をベースとした単一の誘導体による遺伝子送達の報告例もない。

### 発明の開示

本発明は、負電荷を有する物質の細胞内への導入において、より導入効率が高く、細胞に対して毒性の少ない、カチオン性高分子を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた負電荷を有する物質の細胞内への導入法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で、かつ極めて少ない毒性で、細胞内に遺伝子を導入することができることを見出した。

具体的には、本発明者らは、ポリエチレンイミンに複数のセチル基を導入し、図 1 に示すセチル化ポリエチレンイミンを調製し、これにリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリ

ンを混合して、担体組成物を調製した。そして、得られた組成物に蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が挿入されたプラスミドを混合し、これにより形成させた複合体を COS-1 細胞に導入して、蛍光強度の測定による遺伝子導入効率の検討、および生細胞の細胞密度の測定による細胞毒性の検討を行った。その結果、セチル化ポリエチレンジアミンを構成成分とする担体組成物を用いた場合には、従来用いられていたリボソームを用いた場合と比較して、顕著に遺伝子導入効率が高く、しかも細胞に対する毒性が極めて低いことを見出した。

次いで、本発明者らはポリエチレンジアミンの分子量とアルキル基の長さ、および、アルキル基の導入率の異なる 9 種の化合物を合成し遺伝子発現との関連を検討した (図 7、図 8)。その結果、これら分岐型のポリエチレンジアミンの検討では分子量 600 付近、アルキル基はセチル基が *in vitro* 遺伝子発現に好適であることを見出した (表 1)。また、この化合物は遺伝子導入過程で血清の影響を受け難いことが明らかとなった。セチル化ポリエチレンジアミン (ポリエチレンジアミンの分子量は約 600) を DNA と直接複合体を形成させ HepG2 細胞に遺伝子導入した時、50%血清存在下で、従来高い遺伝子導入試薬として知られているリポフェクトアミンの 10 倍以上高い遺伝子発現を示した (表 1)。また、リボソームとして用いた時、正常ウシ脳血管内皮細胞 (BBMC) に対してリポフェクトアミンの 200 倍以上高い遺伝子発現を示した (表 2)。

上記の化合物は分子量分布をもつ市販のポリエチレンジアミンを出発原料としているため構造が不均一である。また、アルキル基の導入率を合成的に厳密にコントロールするのが難かしく、アルキル基の結合位置を確定できないという問題をもつ。そこで、構造を確定できる化合物を新たにデザインし合成した。一つはテトラエチレンペンタミンを出発原料とした 3 種のアルキル化直鎖エチレンジアミン (図 11)、他の一つはス

ベルミンを出発原料とした 5 種のアシル化直鎖スベルミン(図 16)。これら新規化合物の遺伝子発現は期待通り高く、いずれの場合もセチル基を導入した化合物が優れていた。HepG2 細胞に対し血清存在下で、セチル化直鎖エチレンジアミンおよびセチル化直鎖スベルミンは 10 倍以上高い発現を示した(表 3、表 4)。また、血清非存在下で、オクチル化直鎖スベルミンは、セチル化直鎖スベルミンと同様に高い遺伝子発現を示した(表 4)。

上記は *in vitro* の遺伝子導入能の結果である。通常、非ウイルスベクターは *in vitro* の結果が *in vivo* に反映せず、*in vivo* の遺伝子発現は非常に低い問題を抱える。例えば、先行のカチオン性リポソーム(リポフェクトアミン、DC-Chol/DOPE)はマウス皮下担癌モデルの腫瘍内投与で naked DNA より遺伝子発現は低いと報告されている(Gene Ther 1996, 3, 542-548)。そこで、ヒト膀胱癌細胞および神経膠芽腫細胞をマウス皮下に移植した担癌モデルを作製し、このモデルに対する遺伝子発現を検討した。結果は上記と同様、セチル化直鎖エチレンジアミン、セチル化直鎖スベルミンに加えてオクチル化直鎖エチレンジアミン、オクチル化直鎖スベルミン誘導体が naked DNA と比べて明らかに強い遺伝子発現を示した(表 5)。

以上、本発明者らはアシル化分岐ポリエチレンジアミンが、特にリポソームにした時、血清存在下で優れた遺伝子導入能を示すことを見出した。また、これに基づき、更に、アシル化直鎖エチレンジアミン、アシル化直鎖スベルミンを合成し、遺伝子発現を検討した結果、セチルおよびオクチルを 2 ケ導入した誘導体は DNA との複合体とした時、*in vivo* で優れた遺伝子発現を示すことを見出した。

即ち、本発明は、複数の疎水基を導入したポリアルキレンジアミンまたはその塩を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた遺伝子導入

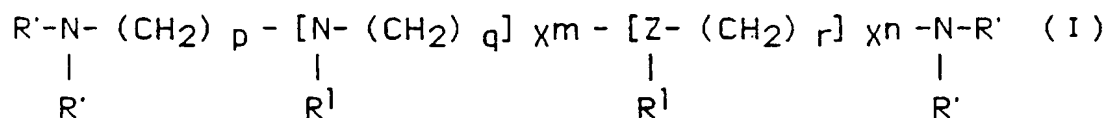


法に関し、より具体的には、

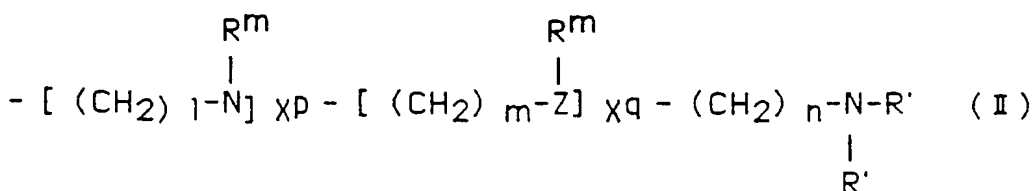
(1) 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物、

(2) 疎水基がコレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、またはリン脂質残基である、(1)に記載の組成物、

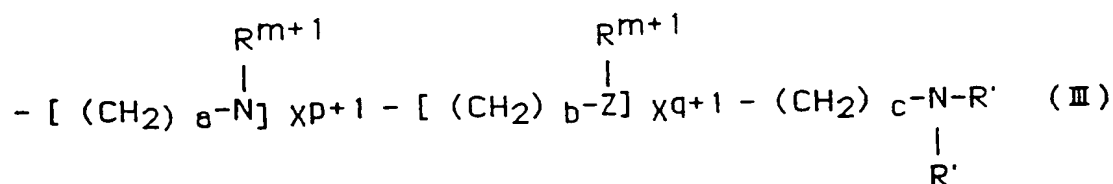
(3) 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンが下記構造式(I)で表される化合物である、(1)に記載の組成物、



(式中、基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、側鎖R<sup>1</sup>は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式(II)を表す。また、式中、p、q、r、X<sup>n</sup>、X<sup>m</sup>は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖  $R^m$  にアミド結合が含まれていてもよく、 $Z$  は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 $R'$  は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの  $R'$  は同一であっても異なってもよく、 $R^m$  は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式 (III) を表す。また、式中、 $l$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $X^p$ 、 $X^q$  は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖  $R^{m+1}$  の基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、 $Z$  は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 $R'$  は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの  $R'$  は同一であっても異なってもよい。また、式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $X^{p+1}$ 、 $X^{q+1}$  は任意の自然数を表す。)

(4) 基本骨格に次式 (IV) の繰り返し構造を含む、(1) から (3) のいずれかに記載の組成物、



(5) テトラエチレンペンタミンが 2 分子ないし 5 分子、直鎖状に連

結した (4) に記載の組成物、

(6)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$  の側鎖のいずれか 2 個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(5) に記載の組成物、

(7)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$  の側鎖のいずれか 2 個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(5) に記載の組成物、

(8) 式 (IV) を含む構造が分岐状に連結した (4) に記載の組成物、

(9)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$  の側鎖のいずれか 2 個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(8) に記載の組成物、

(10)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$  の側鎖のいずれか 2 個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(8) に記載の組成物、

(11) 基本骨格にスベルミン構造を含む、(1) から (3) のいずれかに記載の組成物、

(12) スペルミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結した(11)に記載の組成物、

(13)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(11)に記載の組成物、

(14)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(11)に記載の組成物、

(15) スペルミン構造が分岐状に連結した(11)に記載の組成物、

(16)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(14)に記載の組成物、

(17)  $R'$ 、 $R^1$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(14)に記載の組成物、

(18) さらにリン脂質を含む、(1)から(17)のいずれかに記載

の組成物、

(19) リン脂質が、中性リン脂質または酸性リン脂質である、(18) に記載の組成物、

(20) リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン骨格またはホスファチジルコリン骨格を有する、(19) に記載の組成物、

(21) リン脂質が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンである、(20) に記載の組成物、

(22) 負電荷を有する生理活性物質と、(1) から (21) のいずれかに記載の組成物を含む複合体、

(23) 負電荷を有する生理活性物質が、核酸またはその誘導体である、(22) に記載の組成物を含む複合体、

(24) (22) または (23) に記載の複合体を細胞に接触させる工程を含む、負電荷を有する生理活性物質を細胞内へ導入する方法、

(25) (19) から (21) のいずれかに記載の組成物を製造するための、リン脂質および疎水基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキット、に関する。

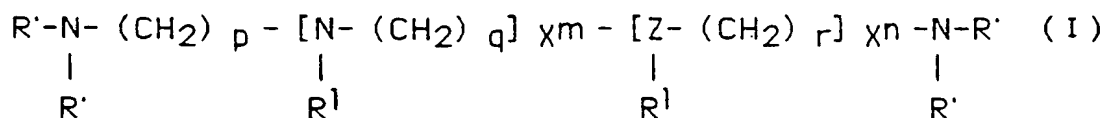
本発明は、疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物に関する。本発明において「ポリアルキレンイミン」とは、プロトン化したアミノ基を有するポリマー分子を指し、直鎖型であっても分岐型であってもよい。ポリアルキレンイミンの構成単位であるアルキレンモノマーは、炭素数が 1 ～ 10 の低級アルキレンイミンであることが好ましく、水に対する溶解性の観点から炭素数が 1 ～ 3 の低級アルキレンイミンであることがさらに好ましい。合成の容易性の観点からは、特にポリエチレンイミンまたはスベルミンであることが好ましい。ポリエチレンイミンは、当業者に公知の方法により製造することができる（例えば、特公昭 49-331230 号公報、特公昭 43-

8828 号公報、米国特許第 4,032,480 号明細書、および米国特許第 4,467,115 号参照)。また、市販品（例えば、ポリエチレンイミン（分子量 600、商品名エボミン（株式会社日本触媒製）、商品名 ExGen 500（Euromedex 社製）、テトラエチレンペンタミン等）を用いてもよい。本発明において用いられるポリエチレンイミンの平均分子量は、通常、200 から 1,000,000 であり、好ましくは 300 から 500,000 であり、さらに好ましくは 500 から 100,000 である。また、スベルミンは市販品を用いることができる。

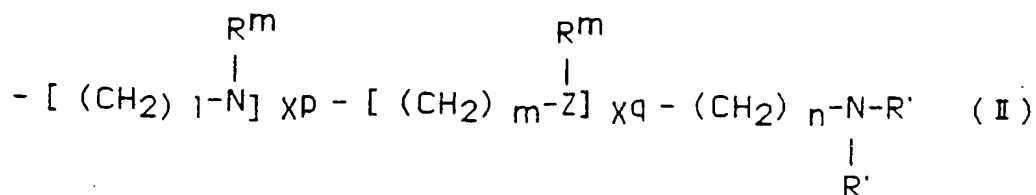
ポリアルキレンイミンに導入する疎水性基としては、ポリアルキレンイミンとリン脂質との親和性を高めるものであれば特に制限はなく、例えば、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、または飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、またはリン脂質残基が挙げられる。好ましくは、オクチル基、セチル基、ステアリル基、オレイル基である。ポリアルキレンイミンには、負電荷物質の細胞内への導入効率を高めるために一分子中に少なくとも 2 つの疎水性基が導入される。但し、疎水性基の導入数を過剰に増加させると、ポリアルキレンイミンの水に対する溶解性が低下してしまうため好ましくない。分子内における好適な疎水性基の数は、当業者であれば、適宜選択することが可能である。ポリアルキレンイミンに導入される疎水性基は、スペーサーを介してポリアルキレンイミンに結合していてもよい。スペーサーとしては、中性の水溶性分子が好ましく、例えば、アミノ酸、ペプチド、ポリアミノ酸、タンパク質、糖、さらにポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン誘導体等の合成高分子およびそれらの誘導体を用いることができる。負電荷物質を輸送するための担体として用いる場合、ポリアルキレンイミンは塩を形成していてもよい。ポリアルキレンイミンの塩

としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、炭酸塩、ギ酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のポリアルキレンイミンの好ましい態様を、下記構造式 (I) に示す。

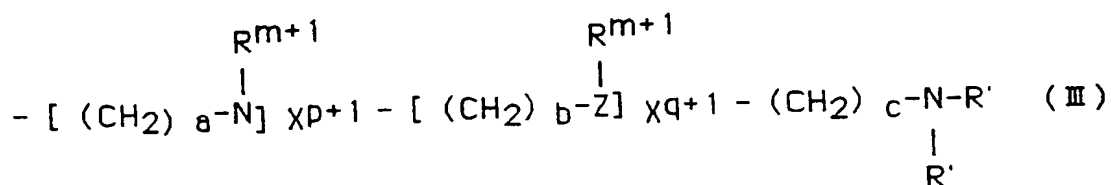


(式中、基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、側鎖R<sup>1</sup>は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式 (II) を表す。また、式中、p、q、r、X<sup>n</sup>、X<sup>m</sup>は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖R<sup>m</sup>にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽

和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、R<sup>m</sup>は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式(III)を表す。また、式中、l、m、n、X<sup>p</sup>、X<sup>q</sup>は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖R<sup>m+1</sup>の基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよい。また、式中、a、b、c、X<sup>p+1</sup>、X<sup>q+1</sup>は任意の自然数を表す。)

該ポリアルキレンイミンは、基本骨格に次式(IV)の繰り返し構造を含むことができ、



好ましくは、テトラエチレンペンタミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結している。

より好ましくは、R', R<sup>l</sup>, R<sup>m</sup>, R<sup>m+1</sup>の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、



トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含み、さらに好ましくは、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む。

該ポリアルキレンイミンにおいて、式(IV)を含む構造は、分岐状に連結していてもよい。

また、本発明のポリアルキレンイミンは、基本骨格にスベルミン構造を含んでいてもよい。好ましくは、スベルミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結している。スベルミン構造は、分岐状に連結していてもよい。

これにより調製された複数の疎水性基が導入されたポリアルキレンイミンは、単独で負電荷物質を輸送するための担体として用いることも可能であるが、さらに、リン脂質と混合することにより、リボソームを形成させて担体として用いることも可能である。疎水基はリン脂質内部に安定化する性質を有するため、疎水基が導入されたポリアルキレンイミンはリボソームにおいて安定的に存在しうると考えられる。リボソームの形成に用いられるリン脂質としては、それ自体で、負電荷を有する生理活性物質と相互作用をしない中性または酸性の脂質であることが好ましい。リン脂質は、天然由来であっても、合成されたものであってもよい。本発明に用いられるリン脂質のアルキル側鎖としては、炭素数12～18のものまたはオレイル基が好ましい。リン脂質としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン骨格を有するジオレオイルホスファチジ

ルエタノールアミンやホスファチジルコリン骨格を有するホスファチジルコリン（例えば、卵黄由来、大豆由来あるいは合成のもの）が好適に用いられる。リン脂質とポリエチレンジイミンの混合比は、混合物が負電荷物質と電氣的親和性を有する程度に正に帯電する範囲であれば、特に制限はない。好ましい混合比は当業者であれば、適宜選択することができる。

また、本発明は負電荷を有する生理活性物質と上記組成物とを含む複合体に関する。負電荷を有する生理活性物質としては、多価の負電荷を有する生理活性物質であれば特に制限はない。多価の負電荷を有する生理活性物質としては、例えば、核酸およびその誘導体が挙げられる。核酸としては、環状および直鎖状の1本鎖もしくは2本鎖のデオキシリボ核酸であっても、リボ核酸であってもよい。核酸の誘導体としては、例えば、ホスフォロチオエート、ホスフォロジチオエート等が例示される。本発明の複合体において、負電荷を有する生理活性物質に対する上記組成物の混合比は、電荷比で1/100当量から20当量であることが好ましい。好適な混合比は、当業者であれば適宜選択することができる。複合体の粒形は、200 nm以下であることが好ましく、100 nm以下であることがさらに好ましい。本発明の複合体の製造において、他の補助剤は特に必要ないが、補助剤としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリン、脂肪酸など両親媒性の分子等を用いることも可能である。

負電荷物質の輸送において本発明のポリアルキレンジイミンを単独で用いる場合には、負電荷物質と直接混合して複合体を形成させた後、公知の方法（O. Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-7301(1995)）に従って負電荷物質を細胞内へ導入することができる。一方、本発明のポリアルキレンジイミンをリン脂質と混合してリボソームを

形成させる場合には、まず、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE、日本精化株式会社製) またはホスファチジルコリン (eggPC、日本精化株式会社製) などのリン脂質と本発明のポリアルキレンイミンを混合し、これを公知の方法 (N. Oku et al., Biochim. Biophys. Acta. 1280, 149-154, (1996))) に従いリボソームの水分散液を調製する。この際、リボソームは膜安定化剤としてコレステロール等のステロール類を、抗酸化剤としてトコフェロール、ビタミン E などを含んでもよい。リビドマイクロスフェアの場合、本発明のポリアルキレンイミンと大豆油と界面活性剤とを加えて公知の方法 (F. Liu et al., Pharmaceutical Res. 13, 1642-1646 (1996))) により目的のリビドマイクロスフェアを得ることができる。これを負電荷物質と混合した後、細胞に接触させることにより、負電荷物質を細胞内へ導入することができる。

また、本発明はリボソームを調製するための、リン脂質および疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキットに関する。本発明のキットにはリン脂質および疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩の他に、さらに、上記の膜安定化剤、抗酸化剤を含んでもよい。本発明のキットに含まれるリン脂質標品及びポリアルキレンイミン標品の最終形態としては、冷蔵、冷凍または凍結乾燥品とすることが可能である。凍結乾燥品の場合は安定化剤としてソルビトール、シュークロース、アミノ酸及び各種タンパク質等を含んでもよい。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例において用いた疎水基を導入したポリエチレンイミンの構造を示す図である。

図 2 は、本発明の組成物と従来のリボソームを用いた場合のプラスミ

ドトリボソームとの荷電比を変えた時の GFP 遺伝子発現を表わす図である。図中、PCL はトリセチル-PEI:DOPE (0.65:1,モル比, ポリエチレンイミン分子量: 600) を示す。同様に DMRIE:DOPE(1:1,モル比)、DOTAP:DOPE(1:1,モル比)を示し、細胞は COS-1 を用いた。また、プロット上の棒線は±SD を示す。

図 3 は、リン脂質の遺伝子発現に及ぼす影響を表わす図である。図中、DOPE-PCL はトリセチル-PEI: DOPE (0.65:1,モル比) を示す。eggPC-PCL はトリセチル-PEI: eggPC (0.65:1,モル比) を示す。

図 4 は、本発明のリボソーム単独またはプラスミド複合体濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、PCL はトリセチル-PEI:DOPE (0.65:1,モル比、PEI 分子量 600) を示す。細胞は COS-1 を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SD の+側を示す。

図 5 は、従来のリボソーム (DMRIE)の単独またはプラスミド複合体の濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、DMRIE lipo. は DMRIE:DOPE(1:1,モル比)を示す。細胞は COS-1 を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SD の+側を示す。

図 6 は、従来のリボソーム (DOTAP)の単独またはプラスミド複合体の濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、DOTAP lipo. は DOTAP:DOPE(1:1,モル比)を示す。細胞は COS-1 を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SD の+側を示す。

図 7 は、分子量 600 のポリエチレンイミンを出発原料としたアルキル化分岐型ポリエチレンイミンの構造を示す。

図 8 は、分子量 1,800 のポリエチレンイミンを出発原料としたアルキル化分岐型ポリエチレンイミンの構造を示す。

図 9 は、アルキル化直鎖型エチレンイミンの合成ルート (1) を示す図である。

図 1 0 は、アルキル化直鎖型エチレンイミンの合成ルート ( 2 ) を示す図である。

図 1 1 は、アルキル化直鎖型エチレンイミンの構造を示す図である。

図 1 2 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート ( 1 ) を示す図である。

図 1 3 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート ( 2 ) を示す図である。

図 1 4 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート ( 3 ) を示す図である。

図 1 5 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート ( 4 ) を示す図である。

図 1 6 は、アルキル化直鎖型スベルミンの構造を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

##### [実施例 1] ポリエチレンイミンの精製

市販のポリエチレンイミン (分子量 600, 商品名エボミン SP-006、株式会社日本触媒製) 2 g を 100ml の蒸留水で溶解し、分画分子量 500 の限外濾過膜 (UH-05, 東洋濾紙製; 限外濾過装置 はアミコン社製、攪拌式セル 8,400 型) で、2-3kg/cm<sup>2</sup> の窒素気流下、1000ml の蒸留水で限外濾過を行った。不純物を除いた限外濾過処理液 (約 20-30ml) を凍結乾燥して精製ポリエチレンイミンを得た。

##### [実施例 2] セチル化ポリエチレンイミンの合成

20ml のクロロホルム中、1g の精製ポリエチレンジイミン(分子量 600)と 1.62g のセチル ブロマイドを混合し(モル比、1:2)、1ml のトリエチルアミンを添加して還流させた。次いで、分画分子量 1000 の限外濾過膜(YM1、アミコン社製)を用い未反応のポリエチレンジイミンを除去した。凍結乾燥したセチル化ポリエチレンジイミンの収率は 70.4%であった。セチル化ポリエチレンジイミンのセチル基の導入数は NMR で検討した。即ち、1.3ppm 付近のセチル基と 2.5-3.5ppm 付近のポリエチレンジイミンのプロトン比は 1 分子のポリエチレンジイミンにセチル基 3 分子が結合していることを支持した。合成したポリエチレンジイミンを図 1 に示す。

### 【実施例 3】 リボソームの調製

リボソームを調製するために、予め 10mM セチル化ポリエチレンジイミンのクロロホルム 溶液と 10mM ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE、日本精化株式会社製)の クロロホルム溶液を調製した。用いた脂質組成はセチル化ポリエチレンジイミン/DOPE=0.65/1(モル比)とした。この脂質をナス型フラスコに取りクロロホルムに溶解した後、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを減圧留去し脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムを高真空下で 1 時間乾燥した後、1mM 溶液となるように DMEM(ギブコ BRL 社製)で水和した。その後、凍結融解を 3 回繰り返し、リボソームをバス型ソニケーターで 10 分間超音波処理した。リボソームは安定ではあるが用時調製した。

また、比較例として、セチル化ポリエチレンジイミンの代わりに 1、2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)または 1、2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)を用いて上記と同様にリボソームを得た。

#### 〔実施例 4〕 プラスミド DNA/リボソーム 複合体の作製

プラスミド DNA は pEGFP-C1 (クローンテック社製) を用いた。このプラスミドは、レポータ遺伝子として GFP (green fluorescent protein) をコードしているため、その遺伝子発現は GFP の蛍光強度を測定することで定量できる。プラスミドを大腸菌で調製、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製し、TE 緩衝液 (pH 7.5) に  $2\mu\text{g/ml}$  の濃度で溶解した。プラスミド DNA 量を一定にし、1.5ml エッペンドルフチューブにとり、各比率の 1mM リボソーム溶液を添加し、100 $\mu\text{l}$  となるよう DMEM を加え、室温で 20 分間インキュベーションした。

#### 〔実施例 5〕 遺伝子導入

COS-1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ディッシュで 35mm ディッシュに播き、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で一夜培養した。DMEM で 2 回洗浄した後、調製したリボソーム/プラスミド DNA 複合体を血清無添加の DMEM で希釈し、全液量 250 $\mu\text{l}$  となるように調製し細胞に添加した。添加後、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 3 時間インキュベーションした。3 時間後、リボソーム/プラスミド DNA 複合体溶液を除去し、血清無添加の DMEM で 2 回洗浄後、10%FBS-DMEM 2ml を加えて 48 時間培養した。

#### 〔実施例 6〕 導入遺伝子発現 (GFP) の定量

上記の 48 時間培養した細胞の培養液を除き血清無添加の DMEM で 2 回洗浄後、最終濃度 1% の濃度で TritonX100 溶液を添加後、室温で 30 分インキュベーションして可溶化した。細胞溶液を懸濁してエッペンドルフチューブに移し 3000rpm で 10 分間遠心した。遺伝子発現量は Ex 493nm、Em 510nm の蛍光強度測定によった。この結果を図 2 に示す。本発明の組成物を用いた場合は対照の DMR1E、DOTAP に比べて遺伝子発現は 2 倍以

上高かった。

〔実施例 7〕 比較リボソームを用いた場合の導入遺伝子発現

実施例 3 で DOPE の代わりに卵黄由来のホスファチジルコリン(eggPC)を用いた以外は実施例 1 ～ 6 と同様にして導入遺伝子発現の定量を行った。図 3 に結果を示した。図 3 からわかるように、eggPC を用いた場合、DOPE に近似した遺伝子発現を示した。

〔実施例 8〕 細胞毒性の検討

COS-1 細胞を 24 ウェルプレート(コーニング社製)に 1 ウェルあたり 1ml ずつ添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で一晩培養しコンフルエントとした。DMEM でウェルを 2 回洗浄後、調製したプラスミド DNA/リボソーム複合体溶液を様々な濃度で 1 ウェルあたり 200μl ずつ添加した。添加後、37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 3 時間インキュベーションした。また、対照として DMEM のみ、リボソーム溶液のみについても同様に行った。

〔実施例 9〕 細胞密度の測定

細胞毒性についてはアラマーブルー (alamerBlue、Biosource International 社、輸入元は岩城硝子株式会社) を用いて行った。まず、それぞれのサンプル溶液を除去し、各ウェルあたり血清無添加の DMEM 200μl および 5 倍希釈したアラマーブルー溶液を 50μl ずつ添加した。添加後、37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 1 時間インキュベーションした。1 時間後、各ウェルの溶液を 1.5ml エッペンドルフチューブにとり、750μl の PBS(-)を加えて 1ml し、Ex 535nm、Em 583nm の蛍光強度測定を行った。その結果を図 4、図 5、図 6 に示す。本発明の組成物を用いた場合には、従来のリボソームを用いた場合に比べて特に高濃度の複合体溶液におい



て著しく細胞毒性が低下していた。

#### [実施例 10] アルキル化分岐ポリエチレンジイミン誘導体の合成

アルキル基鎖長の遺伝子導入能に及ぼす効果を調べるため、実施例 1 および 2 と同様な方法を用いて、分子量 600 のポリエチレンジイミン（以下、PEI (6)、化合物 1、化合物名 P6）にアルキル基を新たに導入した（図 7、図 8）。

#### 化合物 2 の合成

化合物名 P6D20.3（アルキル化度 20.3%）の合成：

ポリエチレンジイミン、PEI (6) 5.0g をエタノール 20ml に溶解し、デシルブロマイド 3.69g (3.45ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75℃で反応させ、8 時間後、TLC にてデシルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 42.2%；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ：0.85 (9H, t, CH<sub>3</sub>-), 1.30 (36H, m, decyl の CH<sub>2</sub>), 2.70 (54H, br, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N-), 3.20 (14H, m, -NH-) δ：0.85 と 2.70 のプロトン比からデシル基が 20.3% 導入されていることを確認した。

#### 化合物 3 の合成

化合物名, P6L18.4（アルキル化度 18.4%）の合成：

PEI (6) 2.0g をエタノール 10ml に溶解し、ラウリルブロマイド 1.66g (1.60ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75℃で反応させ、8 時間後、TLC にてデシルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により

精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 68.4% ;  
 $^1\text{H NMR (D}_2\text{O)}$   $\delta$  : 0.80 (8H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.20 (46H, m, lauryl の  $\text{CH}_2$ ), 2.60 (54H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ )  $\delta$  : 0.80 と 2.60 のプロトン比からラウリル基が 18.4% 導入されていることを確認した。

#### 化合物 4 の合成

化合物名, P6M18.8 (アルキル化度 18.8%) の合成:

PEI (6) 5.0g をエタノール 20ml に溶解し、ミリスチルブロマイド 4.63g (4.97ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてミリスチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 54.8% ;  $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$   $\delta$  : 0.90 (8H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.30 (55H, m, myristyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (55H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ), 3.55 (20H, m,  $-\text{NH}-$ )  $\delta$  : 0.90 と 2.70 のプロトン比からミリスチル基が 18.8% 導入されていることを確認した。

#### 化合物 5 の合成

化合物名, P6C17.5 (アルキル化度 17.5%) の合成:

PEI (6) 1.28g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 1.30g (1.30ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 82.6% ;  $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$   $\delta$  : 0.88 (8H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.25 (60H, m, cetyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (44H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ), 3.90 (8H, m,  $-\text{NH}-$ )  $\delta$  : 0.88 と 2.70 の

プロトン比からセチル基が 17.5%導入されていることを確認した。

#### 化合物 6 の合成

化合物名, P6C24.5 (アルキル化度 24.5%) の合成:

PEI(6)1.0g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 1.02g (1.02ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 85.5%;  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.88 (10H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.25 (75H, m, cetyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.65 (45H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ), 4.88 (22H, m,  $-\text{NH}-$ )  $\delta$ : 0.88 と 2.65 のプロトン比からセチル基が 24.5%導入されていることを確認した。

#### 化合物 7 の合成

化合物名, P6S21.1 (アルキル化度 21.1%) の合成:

PEI(6)5.0g をエタノール 20ml に溶解し、ステアリルブロマイド 5.57g (5.71ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてステアリルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 86.0%;  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.90 (9H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.30 (74H, m, stearyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (57H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ), 3.70 (17H, m,  $-\text{NH}-$ )  $\delta$ : 0.90 と 2.70 のプロトン比からステアリル基が 21.1%導入されていることを確認した。

#### 化合物 8 の合成

化合物名, P6S11.3 (アルキル化度 11.3%) の合成:

PEI (6) 5.0g をエタノール 20ml に溶解し、ステアリルブロマイド 2.78g (2.85ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてステアリルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 53.3% ;  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  : 0.90 (5H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.25 (35H, m, stearyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.60 (56H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ),  $\delta$  : 0.90 と 2.60 のプロトン比からステアリル基が 11.3% 導入されていることを確認した。

同様に、分子量 1,800 (商品名エボミン SP-018、株式会社日本触媒) ポリエチレンイミン (PEI (18) と略称) にセチル (cetyl, C=16) 基を導入し、導入率の異なる 2 種の化合物を合成した。

#### 化合物 9 の合成

化合物名, P18C12.3 (アルキル化度 12.3%) の合成

PEI (6) 1.50g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 0.87g (0.87ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 84.0% ;  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  : 0.88 (15H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.25 (117H, m, cetyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (170H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ), 3.70 (23H, m,  $-\text{NH}-$ )  $\delta$  : 0.88 と 2.70 のプロトン比からセチル基が 12.3% 導入されていることを確認した。

#### 化合物 10 の合成

化合物名, P18C20.6 (アルキル化度 20.6%) の合成

PEI (6)1.0g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 1.19g (1.19ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 92.8%;  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.88 (26H, t,  $\text{CH}_3$ -), 1.25 (207H, m, cetyl の  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (155H, br,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$ ), 5.15 (44H, m,  $-\text{NH}-$ )  $\delta$ : 0.88 と 2.70 のプロトン比からセチル基が 20.6% 導入されていることを確認した。

#### [実施例 11] ストック溶液の調製

実施例 10 で合成した 9 種の誘導体を各々滅菌蒸留水に溶解し、pH を 7 付近に調製した。水で溶解し難い化合物は 50°C で 15-30 分加熱、pH 調製後、プローブ型超音波 (BRONSON 社、20 Duty cycle、5 分) で処理した。全てのキャリアー溶液は最後にフィルター (DISMIC-25cs、Cellulose acetate, 0.2  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC TOYO) で濾過した。

キャリアー溶液の濃度はアミンニトロゲンのモル濃度とした。即ち、分子量 600 のポリエチレンジアミンの濃度はモノマーの分子量を 43 とし、43mg/ml を 100mM (100nmol/ $\mu\text{l}$ ) の陽電荷モル数とした。一方、アルキル化ポリエチレンジアミン溶液の濃度は導入したアルキル基の分子量と導入数を補正して算出した。これらのアルキル化ポリエチレンジアミンのストック溶液は使用時まで 4°C で保存した。

#### [実施例 12] プラスミド溶液の調製法

$\beta$ -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子 (pCMVbeta (Clontech 社) に由来する) をプラスミド pCAGGS (Hum Gene Ther. 1998; 9:1701-7) に挿入し、プラスミド pCAG-LZ15 を構築した。このプラスミドのストック溶液

(5mg DNA/ml TE)を細胞培養用培地の D-MEM (GIBCOBRL 社製)で希釈し 58  $\mu$ g DNA/ml の DNA 溶液を調製した。1  $\mu$ g DNA の負電荷モル数は 3nmol、58  $\mu$ g DNA の負電荷モル数は 58  $\mu$ g x 3n mol=174 nmol とした。

#### [実施例 1 3] 各種誘導体キャリアー溶液の調製法

N/P (N : キャリアーのニトロゲンの陽電荷モル数/P : DNA のリン酸を負電荷モル数の比) が 18 等量となるよう実施例 1 1 のストック溶液を D-MEM で調製した。

#### [実施例 1 4] DNA 複合体の形成法

1.5ml エッペンドルフチューブに実施例 1 2 の DNA 溶液 100  $\mu$ l を入れ、次いで実施例 13 のキャリアー溶液 100  $\mu$ l を加えて軽くボルテックスで混合後、室温で 30 分以上放置し、DNA 複合体 (N/P=18 等量) を形成させた。この操作は遺伝子導入 (DNA のトランスフェクション) の直前に行った。

#### [実施例 1 5] ヒト肝癌細胞への in vitro 遺伝子導入

DNA の遺伝子導入 18 時間前にヒト肝癌細胞の Hep G2 を 24-ウェルディッシュに 30,000 細胞数/ウェルとなるようシードした。遺伝子導入直前に細胞を MEM で 2 回洗浄した。実施例 6 の DNA と複合体溶液を 290ngDNA/200  $\mu$ l/ウェルとなるよう MEM および血清添加 (50%FBS) MEM で希釈しこの遺伝子導入溶液を細胞 200  $\mu$ l/ウェルとなるよう加えた。5%炭酸ガス培養器で 37°C で 3 時間培養後、遺伝子導入溶液を除き、血清 (10%FBS)を含む MEM 培地で 2 回洗浄、次いで同培地を 1ml/ウェルとなるよう加えて 5%炭酸ガス培養器で 37°C で 48 時間培養した。対照の LipofectAMINE (GIBCOBRL, 2mg/ml)は DNA : LipofectAMINE=290  $\mu$ g : 1  $\mu$

g の比率で OPTI-MEM 培地(GIBCOBRL)で DNA 複合体を形成させ同量の DNA を用いた。

#### [実施例 16] Lac Z 活性の測定

実施例 14 の細胞の培地を除き、D-PBS(-)(日研生物医学研究所)で 2 回洗浄、培養細胞溶解試薬、LC $\beta$  (商品名:ピッカジーン、和光純薬販売)を 100 $\mu$ l/ウェルとなるよう加え、室温で 15 分放置、小型のプローブ型超音波装置 (UR-20P、トミー精工社製、Power 10)で 5 秒間処理して細胞を破壊した。この細胞溶解液をウェルから 0.5ml エッペンドルフチューブに移し、遠心 (1,200rpm、3 分、室温) した上清を LacZ 活性の測定に供した。

LacZ 活性の測定は TROPIX, Inc 社のプロトコールに従った。各々の遺伝子導入実験はトリプリケート (triplicate) で行い LacZ 活性は細胞蛋白 (mg)/測定時間 (1 秒間) 当たりの平均 light unit $\pm$ SD で表示した。細胞蛋白は BCA 法 (Pierce 社) によった。

#### [実施例 17] アルキル化分岐ポリエチレンイミン誘導体の in vitro 遺伝子発現

アルキル化分岐型ポリエチレンイミン-DNA 複合体の HepG2 細胞に対する LacZ 遺伝子の発現を比較して表 1 に示した。数値は平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。分子量 600 のポリエチレンイミンにアルキル基を導入することで遺伝子発現は増強した。また、セチル基 (C=16) を導入した P6C24.5、P6C17.5 と DNA の DNA 複合体の遺伝子発現は最も高く、LipofectAMINE に比べ血清非存在下で遺伝子導入した時は約 4 倍、50%血清存在下で形質転換した時は 10 倍以上高い値を示した。

セチル誘導体につきポリエチレンイミンの分子量を比較したが分子量

600 が 1,800 より高い値を示した。

表 1

化合物	化合物 番号	遺伝子発現 LacZ (RLU/ $\mu$ g · sec)	
		No serum	50% Serum
P6	1	998 $\pm$ 277	675 $\pm$ 405
P6D20.3	2	87,740 $\pm$ 15,127	485 $\pm$ 216
P6L18.4	3	343,267 $\pm$ 3,449	25,178 $\pm$ 5,649
P6M18.8	4	193,790 $\pm$ 24,371	307 $\pm$ 135
P6C17.5	5	453,539 $\pm$ 7,415	446,556 $\pm$ 50,168
P6C24.5	6	458,970 $\pm$ 24,796	467,869 $\pm$ 8,685
P6S21.1	7	282,858 $\pm$ 29,015	168,580 $\pm$ 18,461
P6S11.3	8	196,244 $\pm$ 17,181	119,383 $\pm$ 19034
P18C12.3	9	217,607 $\pm$ 7,083	80,766 $\pm$ 7,426
P18C20.6	10	34,336 $\pm$ 6,861	28,585 $\pm$ 4,520
LipofectAMINE		113,637 $\pm$ 48,504	34,847 $\pm$ 5,483

#### [実施例 18] リボソームとの 遺伝子発現比較

P6C24.5 と DNA との複合体の遺伝子発現をリボソームと DNA の複合体 (PCL) と比較した。リボソーム組成は P6C24.5/DOPE (1:1, モル比) とし調製法は実施例 3 に準じた。DNA 複合体の調製法は実施例 12-14 に準じた。細胞は正常ウシ脳血管内皮細胞 (BBMC、セルシステムズ社、大日本製薬株式会社販売) を用い、実施例 15 と同様の方法で遺伝子導入を行った。

結果を表 2 に示す。表中、PCL は P6C24.5/DOPE (1:1、モル比) を示し、数値は平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。PCL と DNA 複合体の遺伝子発現は、血



清非存在下で遺伝子導入した時、P6C24.5 単独とほぼ同等、LipofectAMINE の約 10 倍高い値であった。一方、血清存在下で遺伝子導入すると、PCL と DNA 複合体の遺伝子発現は、P6C24.5 単独の 10 倍以上、LipofectAMINE の約 200 倍高い値であった。

表 2

	電荷比 (eq)	遺伝子発現 LacZ (RLU/ $\mu$ g $\cdot$ sec)	
		No serum	50% Serum
P6C24.5	18eq	214,053 $\pm$ 72,524	5,634 $\pm$ 1,381
PCL	9eq	192,369 $\pm$ 24,775	78,051 $\pm$ 5,891
LipofectAMINE		20,628 $\pm$ 11,680	41 $\pm$ 3

#### [実施例 19] アルキル化直鎖エチレンイミンの合成

図 9-10 に示した合成ルートに従い、図 11 に示した 3 種のアルキル化直鎖型エチレンイミンを合成した。以下に合成法を示す。

##### 化合物 12 の合成 (図 9)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.462 g、11.6 mmol) をジメチルホルムアミド (160 ml) に懸濁させ、氷冷下にてテトラエチレンペンタミンペンタトシレート (化合物 11、10.1 g、10.5 mmol) のジメチルホルムアミド (40 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 3-[(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ]-1-ブロモプロパン (2.92 g、11.5 mmol) を滴下した。反応液を室温で 20 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (500 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (2:1) で溶出された分画を集め

て、化合物 2 (3.57 g) を白色の粉末として得た。収率 30% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.024 (6H, s), 0.88 (9H, s), 1.65-1.78 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.44 (3H, s), 2.45 (3H, s), 3.10-3.45 (18H, m), 3.58 (2H, t,  $J=6.0$  Hz), 5.39 (1H, t,  $J=5.9$  Hz), 7.23-7.38 (10H, m), 7.65-7.83 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1132  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 1 3 の合成 (図 9)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0644 g、1.61 mmol) をジメチルホルムアミド (24 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 1 2 (1.52 g、1.34 mmol) のジメチルホルムアミド (6 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 1-ブロモヘキサデカン (491  $\mu\text{l}$ 、1.61 mmol) を滴下した。反応液を室温で 6 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (35 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (3:1) で溶出された分画を集めて、化合物 1 3 (1.64 g) を白色の粉末として得た。収率 90% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.023 (6H, s), 0.80-0.95 (3H, m), 0.88 (9H, s), 1.10-1.35 (26H, m), 1.42-1.55 (2H, m), 1.64-1.80 (2H, m), 2.40 (6H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.11 (2H, m), 3.16-3.23 (2H, m), 3.25-3.45 (16H, m), 3.58 (2H, t,  $J=5.9$  Hz), 7.25-7.36 (10H, m), 7.71-7.86 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1356  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 1 4 の合成 (図 9)

化合物 1 2 (1.47 g、1.30 mmol) および 1-ブロモドデカン (373  $\mu\text{l}$ 、1.56 mmol) から、化合物 1 3 の合成と同様に操作し、化合物 1 4 (1.48 g) を白色の粉末として得た。収率 88% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.023 (6H,

s), 0.80-0.95 (3H, m), 0.88 (9H, s), 1.10-1.35 (18H, m), 1.41-1.58 (2H, m), 1.65-1.80 (2H, m), 2.40 (6H, s), 2.41 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.11 (2H, m), 3.16-3.23 (2H, m), 3.25-3.45 (16H, m), 3.58 (2H, t,  $J=5.9$  Hz), 7.25-7.36 (10H, m), 7.71-7.81 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1300  $[M+H]^+$ .

#### 化合物 1 5 の合成 (図 9)

化合物 1 2 (0.803 g、0.709 mmol) および 1-ブロモオクタン (147  $\mu$ l、0.851 mmol) から、化合物 1 3 の合成と同様に操作し、化合物 1 5 (0.730 g) を白色の粉末として得た。収率 83% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.023 (6H, s), 0.87 (3H, t,  $J=6.6$  Hz), 0.88 (9H, s), 1.10-1.35 (10H, m), 1.45-1.57 (2H, m), 1.66-1.77 (2H, m), 2.40 (6H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.12 (2H, m), 3.15-3.24 (2H, m), 3.23-3.45 (16H, m), 3.58 (2H, t,  $J=5.9$  Hz), 7.26-7.35 (10H, m), 7.70-7.81 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1244  $[M+H]^+$ .

#### 化合物 1 6 の合成 (図 9)

化合物 1 3 (1.63 g、1.20 mmol) のテトラヒドロフラン (33 ml) 溶液に、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (1.44 ml、1.44 mmol) を氷冷下にて滴下した。室温で 1.5 時間攪拌した後、反応液を水で希釈し、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を水洗・乾燥・濃縮し、得られた残渣をシリカゲル (30 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (1.30 g) を白色の粉末として得た。収率 87% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.34 (26H, m), 1.45-1.55 (2H, m), 1.74-1.84 (2H, m), 2.26 (1H, t,  $J=6.2$  Hz, -OH),

2.405 (3H, s), 2.415 (3H, s), 2.422 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.10 (2H, m), 3.22 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 3.25-3.46 (16H, m), 3.66-3.76 (2H, m), 7.26-7.35 (10H, m), 7.70-7.80 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1242 $[M+H]^+$ .

#### 化合物 17 の合成 (図 9)

化合物 14 (1.47 g、1.13 mmol) およびテトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (1.36 ml、1.36 mmol) から出発し、化合物 16 の合成と同様に操作し、化合物 17 (1.21 g) を白色の粉末として得た。収率 91% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.16-1.35 (18H, m), 1.44-1.56 (2H, m), 1.74-1.85 (2H, m), 2.27 (1H, t,  $J=6.0$  Hz, -OH), 2.405 (3H, s), 2.415 (3H, s), 2.423 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.12 (2H, m), 3.22 (2H, t,  $J=6.8$  Hz), 3.25-3.45 (16H, m), 3.66-3.74 (2H, m), 7.26-7.35 (10H, m), 7.70-7.80 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1186  $[M+H]^+$ .

#### 化合物 18 の合成 (図 9)

化合物 15 (0.590 g、0.474 mmol) およびテトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (0.57 ml、0.57 mmol) から出発し、化合物 16 の合成と同様に操作し、化合物 18 (0.513 g) を白色の粉末として得た。収率 96% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.87 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.35 (10H, m), 1.44-1.56 (2H, m), 1.75-1.85 (2H, m), 2.26 (1H, t,  $J=6.2$  Hz, -OH), 2.41 (3H, s), 2.415 (3H, s), 2.423 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.12 (2H, m), 3.22 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 3.26-3.44 (16H, m), 3.66-3.75 (2H, m), 7.27-7.35 (10H, m), 7.70-7.80 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1130  $[M+H]^+$ .

## 化合物 19 の合成 (図 9)

化合物 16 (1.30 g、1.05 mmol) と四臭化炭素 (1.25 g、3.77 mmol) のメチレンクロリド (26 ml) 溶液に、トリフェニルホスフィン (0.988 g、3.77 mmol) を氷冷下で加えた。氷冷下で 20 分間、更に室温で 1 時間攪拌した後、反応液を減圧下で乾固した。得られた残渣をシリカゲル (60 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (3:1) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (1.34 g) を白色の粉末として得た。収率 98% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.35 (26H, m), 1.43-1.55 (2H, m), 2.07-2.18 (2H, m), 2.405 (3H, s), 2.413 (3H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.12 (2H, m), 3.18-3.46 (20H, m), 7.26-7.36 (10H, m), 7.70-7.82 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1304 and 1306  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 化合物 20 の合成 (図 9)

化合物 17 (1.19 g、1.10 mmol)、四臭化炭素 (1.20 g、3.61 mmol)、トリフェニルホスフィン (0.947 g、3.61 mmol) から、化合物 19 の合成と同様に操作し、化合物 20 (1.21 g) を白色の粉末として得た。収率 97% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.35 (18H, m), 1.44-1.56 (2H, m), 2.07-2.18 (2H, m), 2.405 (3H, s), 2.414 (3H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.10 (2H, m), 3.14-3.45 (20H, m), 7.26-7.36 (10H, m), 7.70-7.82 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1248 and 1250  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 化合物 21 の合成 (図 9)

化合物 18 (1.00 g、0.886 mmol)、四臭化炭素 (1.06 g、3.19 mmol)、

トリフェニルホスフィン (0.837 g, 3.19 mmol) から、化合物 19 の合成と同様に操作し、化合物 21 (1.05 g) を白色の粉末として得た。収率 99% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.87 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.16-1.34 (10H, m), 1.44-1.55 (2H, m), 2.07-2.18 (2H, m), 2.405 (3H, s), 2.413 (3H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.10 (2H, m), 3.19-3.44 (20H, m), 7.26-7.36 (10H, m), 7.70-7.84 (10H, m). FAB MS  $m/z$  : 1192 and 1194  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 22 の合成 (図 10)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0404 g, 1.01 mmol) をジメチルホルムアミド (28 ml) に懸濁させ、氷冷下にてテトラエチレンペンタミンペンタトシレート (化合物 11、0.404 g, 0.421 mmol) のジメチルホルムアミド (2 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下化合物 19 (1.32 g, 1.01 mmol) のジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 18 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (60 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (2:1) で溶出される粗生成物を、液体中圧クロマトグラフィー (ローバー B カラム) で精製した。ヘキサン-酢酸エチル (3:2) で溶出される分画を集めて、表記の化合物 (1.07 g) を白色の粉末として得た。収率 75% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (6H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.35 (52H, m), 1.43-1.56 (4H, m), 1.90-2.04 (4H, m), 2.36 (12H, s), 2.37 (3H, s), 2.38 (12H, s), 2.39 (12H, s), 2.41 (6H, s), 3.02-3.46 (60H, m), 7.24-7.33 (30H, m), 7.67-7.82 (30H, m).

#### 化合物 23 の合成 (図 10)

化合物 1 1 (0.384 g、0.399 mmol) および化合物 2 0 (1.20 g、0.959 mmol) から、化合物 2 2 の合成と同様に操作し、化合物 2 3 (1.02 g) を白色の粉末として得た。収率 77% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (6H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.35 (36H, m), 1.43-1.56 (4H, m), 1.90-2.04 (4H, m), 2.36 (12H, s), 2.37 (3H, s), 2.38 (12H, s), 2.39 (12H, s), 2.41 (6H, s), 3.02-3.46 (60H, m), 7.23-7.34 (30H, m), 7.67-7.82 (30H, m).

#### 化合物 2 4 の合成 (図 1 0)

化合物 1 1 (0.387 g、0.402 mmol) および化合物 2 1 (1.15 g、0.966 mmol) から、化合物 2 2 の合成と同様に操作し、化合物 2 4 (0.962 g) を白色の粉末として得た。収率 75% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.87 (6H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.15-1.35 (20H, m), 1.42-1.56 (4H, m), 1.90-2.04 (4H, m), 2.36 (12H, s), 2.37 (3H, s), 2.38 (12H, s), 2.39 (12H, s), 2.41 (6H, s), 3.02-3.46 (60H, m), 7.23-7.34 (30H, m), 7.66-7.82 (30H, m).

#### 化合物 2 5 の合成 (図 1 0)

化合物 2 2 (0.752 g、0.220 mmol) に 25%臭化水素・酢酸溶液 (15 ml) を加え、100°Cで 18 時間反応させた。放冷後、溶媒を溜去して得られる残渣にエーテルを添加し、濾過することにより表記の化合物 HBr 塩 (0.395 g) を白色の粉末として得た。収率 78% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0.83 (6H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.18-1.45 (52H, m), 1.63-1.76 (4H, m), 2.15-2.28 (4H, m), 3.07-3.16 (4H, m), 3.22-3.33 (8H, m), 3.40-3.64 (48H, m). FAB MS  $m/z$  : 1096  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 2 6 の合成 (図 1 0)

化合物 2 3 (0.814 g、0.247 mmol) から化合物 2 5 の合成と同様に操

作し、表記の化合物 HBr 塩 (0.429 g) を白色の粉末として得た。収率 79% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0.85 (6H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.18-1.44 (36H, m), 1.63-1.76 (4H, m), 2.14-2.27 (4H, m), 3.08-3.16 (4H, m), 3.25-3.34 (8H, m), 3.43-3.64 (48H, m). FAB MS  $m/z$  : 984  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 27 の合成 (図 10)

化合物 24 (0.808 g、0.254 mmol) から化合物 25 の合成と同様に操作し、表記の化合物 HBr 塩 (0.451 g) を白色の粉末として得た。収率 85% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0.85 (6H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.18-1.45 (20H, m), 1.63-1.76 (4H, m), 2.14-2.29 (4H, m), 3.08-3.16 (4H, m), 3.25-3.33 (8H, m), 3.43-3.63 (48H, m). FAB MS  $m/z$  : 872  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 【実施例 20】 アルキル化直鎖スベルミンの合成

図 12-15 に示した合成ルートに従い、図 16 に示した 5 種のアルキル化直鎖型スベルミンを合成した。以下に合成法を示す。

#### 化合物 28 の合成 (図 12)

スベルミン四塩酸塩 (10.2g、29.4 mmol) から、Raymond らの方法 (J. Med. Chem. 1988, 31, 1183-1190) に従い、化合物 28 (22.6 g) を白色の粉末として得た。収率 94%.

#### 化合物 29 の合成 (図 12)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.313 g、7.81 mmol) をジメチルホルムアミド (90 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 28 (5.33 g、6.51 mmol) のジメチルホルムアミド (10 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 1-ブロモヘキサデカン (2.39 ml、7.81 mmol) を滴



下した。反応液を室温で6時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで2回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル(130 g)を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル(2:1)で溶出された分画を集めて、化合物29(2.30 g)を粘稠な油状物として得た。収率34%； $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.88 (3H, t,  $J=6.8$  Hz), 1.13-1.35 (26H, m), 1.37-1.49 (2H, m), 1.50-1.59 (4H, m), 1.74-1.90 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.96-3.16 (14H, m), 5.30 (1H, t,  $J=6.4$  Hz), 7.24-7.34 (8H, m), 7.61-7.77 (8H, m). FAB MS  $m/z$ : 1042  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物30の合成(図12)

化合物28(4.06 g、4.88 mmol)および1-ブロモドデカン(1.40 ml、5.86 mmol)から、化合物29の合成と同様に操作し、化合物30(1.73 g)を油状物として得た。収率36%； $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.88 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.12-1.36 (18H, m), 1.37-1.49 (2H, m), 1.50-1.63 (4H, m), 1.72-1.90 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.95-3.22 (14H, m), 5.30 (1H, t,  $J=6.6$  Hz), 7.24-7.34 (8H, m), 7.60-7.76 (8H, m). APCI MS  $m/z$ : 987  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物31の合成(図12)

化合物28(4.00 g、4.88 mmol)および1-ブロモオクタン(1.02 ml、5.86 mmol)から、化合物29の合成と同様に操作し、化合物31(1.73 g)を油状物として得た。収率38%； $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J=7.0$  Hz), 1.13-1.36 (10H, m), 1.38-1.47 (2H, m), 1.51-1.60 (4H, m), 1.72-1.90 (4H, m), 2.35 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43

(3H, s), 2.95-3.22 (14H, m), 5.30 (1H, t,  $J=6.8$  Hz), 7.24-7.35 (8H, m), 7.61-7.76 (8H, m). APCI MS  $m/z$  : 931  $[M+H]^+$ .

#### 化合物 3 2 の合成 (図 1 2)

化合物 2 8 (5.06 g、6.10 mmol) および 1-ブロモブタン (797  $\mu$ l、7.33 mmol) から、化合物 2 9 の合成と同様に操作し、化合物 3 2 (2.11 g) を油状物として得た。収率 39% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.87 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 1.16-1.34 (2H, m), 1.36-1.48 (2H, m), 1.50-1.64 (4H, m), 1.68-1.94 (4H, m), 2.35 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.90-3.22 (14H, m), 5.30 (1H, t,  $J=6.6$  Hz), 7.20-7.38 (8H, m), 7.64-7.77 (8H, m). APCI MS  $m/z$  : 875  $[M+H]^+$ .

#### 化合物 3 3 の合成 (図 1 2)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.582 g、14.5 mmol) をジメチルホルムアミド (85 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 8 (4.96 g、6.06 mmol) のジメチルホルムアミド (15 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 3-[(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ]-1-ブロモプロパン (3.68 g、14.5 mmol) を滴下した。反応液を室温で 16 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (160 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (3:1) で溶出された分画を集めて、化合物 3 3 (5.94 g) を油状物として得た。収率 84% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.022 (12H, s), 0.84-0.91 (18H, m), 1.46-1.62 (4H, m), 1.62-1.76 (4H, m), 1.78-1.96 (4H, m), 2.41 (6H, s), 2.42 (6H, s), 3.00-3.26 (16H, m), 3.56 (4H, t,  $J=5.9$  Hz), 7.25-7.34 (8H, m), 7.63-7.71 (8H, m). FAB MS  $m/z$  : 1185  $[M+Na]^+$ .

## 化合物 3 4 の合成 (図 1 2)

化合物 3 3 (5.94g、5.10mmol) のテトラヒドロフラン (100ml) 溶液に、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (12.2ml、12.2mmol) を氷冷下にて滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、反応液を水で希釈し、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮し、得られた残渣をシリカゲル (120g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (1:4) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (4.55g) を白色の粉末として得た。収率 95% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.54-1.68 (4H, m), 1.70-1.82 (4H, m), 1.83-1.96 (4H, m), 2.42 (6H, s), 2.43 (6H, s), 2.52 (2H, t,  $J=5.8$  Hz, -OH), 3.06-3.26 (16H, m), 3.70 (4H, q,  $J=5.7$  Hz), 7.25-7.35 (8H, m), 7.62-7.73 (8H, m). FAB MS  $m/z$  : 935  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 化合物 3 5 の合成 (図 1 2)

化合物 3 4 (4.55g、4.87mmol) と四臭化炭素 (7.75g、23.4mmol) のメチレンクロリド (80ml) 溶液に、トリフェニルホスフィン (6.14g、23.4mmol) を氷冷下で加えた。氷冷下で 1 時間攪拌した後、反応液を減圧下で乾固した。得られた残渣をシリカゲル (150g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。0.5% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、表記の化合物 (4.37g) を白色の粉末として得た。収率 90% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.52-1.68 (4H, m), 1.80-1.94 (4H, m), 2.04-2.18 (4H, m), 2.42 (12H, s), 3.07-3.26 (16H, m), 3.39 (4H, t,  $J=6.4$  Hz), 7.23-7.37 (8H, m), 7.60-7.77 (8H, m). APCI MS  $m/z$  : 1059, 1061 and 1063  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 化合物 3 6 の合成 (図 1 3)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.209g、5.23mmol) をジメチルホルムアミド (45ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 9 (2.27g、2.18mmol) のジメチルホルムアミド (8ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下化合物 3 5 (0.964g、0.908mmol) のジメチルホルムアミド (7ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 2 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣を少量のメチレンクロリドに溶解し、さらに酢酸エチルを過剰に加えて室温で 3 時間放置した。析出した結晶を吸引濾過にて回収して、表記の化合物 (2.04g) を白色の粉末として得た。収率 75%。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.88 (6H, t,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 1.15-1.35 (52H, m), 1.37-1.47 (4H, m), 1.48-1.61 (14H, m), 1.74-1.94 (14H, m), 2.39 (36H, s), 2.95-3.22 (48H, m), 7.24-7.33 (24H, m), 7.58-7.75 (24H, m).

## 化合物 3 7 の合成 (図 1 3)

化合物 3 0 (1.73 g、1.79 mmol) および 化合物 3 5 (0.844 g、0.795 mmol) から、化合物 3 6 の合成と同様に操作し、化合物 3 7 (1.09 g) を白色の粉末として得た。収率 48% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.88 (6H, t,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 1.12-1.36 (36H, m), 1.38-1.46 (4H, m), 1.48-1.63 (14H, m), 1.74-1.92 (14H, m), 2.39 (36H, s), 2.95-3.25 (48H, m), 7.20-7.35 (24H, m), 7.55-7.75 (24H, m). FAB MS  $m/z$  : 2871  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 化合物 3 8 の合成 (図 1 3)

化合物 3 1 (1.73 g、1.86 mmol) および 化合物 3 5 (0.820 g、0.773 mmol) から、化合物 3 6 の合成と同様に操作し、化合物 3 8 (1.39 g)

を白色の粉末として得た。収率 65% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.87 (6H, t,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 1.10-1.33 (20H, m), 1.38-1.47 (4H, m), 1.48-1.63 (14H, m), 1.74-1.94 (14H, m), 2.39 (36H, s), 3.00-3.15 (48H, m), 7.23-7.33 (24H, m), 7.60-7.75 (24H, m). FAB MS  $m/z$  : 2783  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### 化合物 39 の合成 (図 13)

化合物 32 (1.59 g、1.83 mmol) および 化合物 35 (0.882 g、0.831 mmol) から、化合物 36 の合成と同様に操作し、化合物 39 (1.33 g) を白色の粉末として得た。収率 60% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.86 (6H, t,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 1.26-1.27 (4H, m), 1.34-1.48 (4H, m), 1.48-1.66 (14H, m), 1.74-1.94 (14H, m), 2.39 (36H, s), 2.95-3.25 (48H, m), 7.22-7.36 (24H, m), 7.55-7.75 (24H, m). FAB MS  $m/z$  : 2649  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 40 の合成 (図 13)

化合物 36 (1.01 g、0.339 mmol) に 25%臭化水素・酢酸溶液 (10 ml) を加え、 $100^\circ\text{C}$  で 6 時間反応させた。さらに 25%臭化水素・酢酸溶液 (10 ml) を追加して  $100^\circ\text{C}$  で 19 時間反応させた。放冷後、溶媒を溜去して得られる残渣にエーテルを添加し、濾過することにより表記の化合物 HBr 塩 (0.628 g) を得た。収率 88% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0.88 (6H, s), 1.20-1.45 (52H, m), 1.50-1.70 (4H, m), 1.75-1.90 (14H, m), 2.05-2.25 (14H, m), 3.00-3.30 (48H, m), APCI MS  $m/z$  : 1135  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 41 の合成 (図 13)

化合物 37 (1.09 g、0.379 mmol) から、化合物 40 の合成と同様に操作し、化合物 41 (0.541 g) を得た。収率 72% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0.85 (6H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 1.18-1.43 (36H, m), 1.60-1.72 (4H, m),

1.73-1.90 (14H, m), 2.00-2.20 (14H, m), 3.00-3.30 (48H, m), APCI MS  
m/z : 1023 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 化合物 4 2 の合成 (図 1 3)

化合物 3 8 (1.03 g、0.363 mmol) から、化合物 4 0 の合成と同様に操作し、化合物 4 2 (0.280 g) を得た。収率 41% ; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ : 0.85 (6H, t, J=7.0Hz), 1.23-1.42 (20H, m), 1.60-1.73 (4H, m), 1.74-1.89 (14H, m), 2.00-2.22 (14H, m), 3.00-3.32 (48H, m), APCI MS m/z : 911 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 化合物 4 3 の合成 (図 1 3)

化合物 3 9 (1.14 g、0.430 mmol) から、化合物 4 0 の合成と同様に操作し、化合物 4 3 (0.571 g) を得た。収率 75% ; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ : 0.91 (6H, t, J=7.6Hz), 1.30-1.49 (4H, m), 1.57-1.72 (4H, m), 1.73-1.90 (14H, m), 2.03-2.23 (14H, m), 3.00-3.32 (48H, m), APCI MS m/z : 799 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 化合物 4 4 の合成 (図 1 4)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.544 g、13.6 mmol) をジメチルホルムアミド (180 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 8 (10.1 g、12.4 mmol) のジメチルホルムアミド (20 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 3-[(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ]-1-ブロモプロパン (3.44 g、13.6 mmol) を滴下した。反応液を室温で 17 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (250 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エ

チル (1:1) で溶出された分画を集めて、化合物 4 4 (4.52 g) を白色の粉末として得た。収率 37%。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.017 (6H, s), 0.84-0.89 (9H, s), 1.48-1.58 (4H, m), 1.60-1.71 (2H, m), 1.72-1.93 (4H, m), 2.41 (4H, s), 2.42 (4H, s), 2.43 (4H, s), 2.93-3.25 (14H, m), 3.55 (2H, t, J=6.0 Hz), 5.30 (1H, t, J=6.4 Hz), 7.23-7.34 (8H, m), 7.55-7.77 (8H, m). APCI MS m/z : 991 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 化合物 4 5 の合成 (図 1 4)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0499 g、1.24 mmol) をジメチルホルムアミド (20 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 4 4 (1.02 g、1.04 mmol) のジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌後、氷冷下にて 化合物 3 5 (0.506g、0.471mmol) のジメチルホルムアミド (5ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 22 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (30 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で残存する化合物 4 4 を溶出した後、5% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、化合物 4 5 (0.92 g) を白色の粉末として得た。収率 68% ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.013 (12H, m), 0.85-0.88 (18H, m), 1.45-1.58 (14H, m), 1.60-1.74 (4H, m), 1.76-1.94 (14H, m), 2.30-2.48 (36H, m), 2.95-3.25 (48H, m), 3.54 (4H, t, J=6.0 Hz), 7.23-7.34 (24H, m), 7.58-7.73 (24H, m).

#### 化合物 4 6 の合成 (図 1 4)

化合物 4 5 (0.901g、0.313mmol) のテトラヒドロフラン (18ml) 溶液に、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M)

溶液 (0.75ml、0.75mmol) を氷冷下にて滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、反応液を水で希釈し、メチレンクロリドで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮し、得られた残渣をシリカゲル (17g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。2% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、表記の化合物 (0.780g) を白色の粉末として得た。収率 94% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.46-1.60 (14H, m), 1.68-1.76 (4H, m), 1.78-1.94 (14H, m), 2.40 (36H, s), 2.47 (2H, t,  $J=6.0$  Hz, -OH), 2.98-3.24 (48H, m), 3.67 (4H, q,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 7.24-7.33 (24H, m), 7.55-7.75 (24H, m).

#### 化合物 4 7 の合成 (図 1 5)

化合物 4 6 (0.761g、0.286mmol) のメチレンクロリド (12ml) 溶液に四臭化炭素 (0.947g、2.86mmol) とトリフェニルホスフィン (0.750g、2.86mmol) を氷冷下で加えた。室温で 1.5 時間攪拌した後、反応液を減圧下で乾固した。得られた残渣をシリカゲル (40g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (1:3) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (0.744g) を白色の粉末として得た。収率 94%。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.40-1.66 (14H, m), 1.74-1.97 (14H, m), 2.02-2.16 (4H, m), 2.40 (36H, s), 2.94-3.24 (48H, m), 3.37 (4H, t,  $J=6.4$  Hz), 7.23-7.35 (8H, m), 7.55-7.77 (24H, m).

#### 化合物 4 8 の合成 (図 1 5)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0307 g、0.769 mmol) をジメチルホルムアミド (18 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 9 (0.668 g、0.641 mmol) のジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌後、氷冷下にて 化合物 4 7 (0.731g、0.263mmol) のジメチ



ルホルムアミド (5ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 4 時間攪拌した後、水中に注ぎ、メチレンクロリドで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (30 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で残存する化合物 29 を溶出した後、2% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、化合物 48 (0.761 g) を白色の粉末として得た。収率 62% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.88 (6H, t,  $J=6.4$  Hz), 1.12-1.34 (52H, m), 1.40-1.48 (4H, m), 1.49-1.62 (24H, m), 1.73-1.95 (4H, m), 2.38 (30H, s), 2.39 (30H, s), 2.97-3.27 (80H, m), 7.23-7.33 (40H, m), 7.55-7.74 (40H, m).

#### 化合物 49 の合成 (図 15)

化合物 48 (0.742 g, 0.158 mmol) に 25%臭化水素・酢酸溶液 (15 ml) を加え、100°C で 4 時間反応させた。さらに 25%臭化水素・酢酸溶液 (7.5 ml) を追加して 100°C で 19 時間反応させた。放冷後、溶媒を溜去して得られる残渣にエーテルを添加し、濾過することにより表記の化合物 HBr 塩 (0.442 g) を得た。収率 86% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0.93 (6H, m), 1.30-1.60 (52H, m), 1.70-1.80 (4H, m), 1.80-2.00 (24H, m), 2.10-2.35 (24H, m), 3.08-3.48 (80H, m). APCI MS  $m/z$  : 1619  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### [実施例 21] ストック溶液の調製

実施例 19、20 で合成した 8 種の誘導体の HBr 塩を秤量、滅菌蒸留水を加え、1N-NaOH で pH を 7 付近に調製後各々のストック溶液を調製した。水で溶解し難い化合物は 80°C で 15-30 分加熱、室温に戻して pH 調製後、プローブ型超音波 (BRONSON 社、20 Duty cycle、5 分) で処理した。全てのキャリアー溶液は最後にフィルター (DISMIC-25cs、Cellulose

acetate, 0.2  $\mu$ m, ADVANTEC TOYO)で濾過した。キャリアー溶液の濃度はアミンニトロゲンのモル濃度とした。即ち、ストック溶液は 10mM の (10nmol/ $\mu$ l) 陽電荷モル数とした。これらのストック溶液は使用時まで 4°C で保存した。使用時、沈殿したストック溶液は一旦、80°C で 15-30 分加熱溶解して用いた。

〔実施例 2 2〕 アルキル化直鎖エチレンイミンの in vitro 遺伝子導入

アルキル化直鎖エチレンイミンのヒト肝癌細胞 (Hep G2) に対する遺伝子発現を検討した (表 3)。表中、数値は平均値  $\pm$  SD (n=3) を示す。化合物は TEL-D8、TEL-D12、TEL-D16 を用い、方法は実施例 12-16 に準じた。これらの中で、TEL-D16 は最も高い遺伝子発現を示した。TEL-D16 の遺伝子発現はトランスフェクション時の血清添加の有無にかかわらず LipofectAMINE の約 10 倍高い値であった。

表 3

化合物名	化合物 番号	電荷比 (eq)	遺伝子発現 LacZ (RLU/μg・sec)	
			No serum	50% Serum
TEL-D8	27	9	179±41	163±23
		18	177±67	146±20
TEL-D12	26	9	295±198	134±10
		18	4,130±3,316	128±6
TEL-D16	25	9	106,494±22,206	23,608±8,655
		18	155,013±8,191	17,593±6,292
LipofectAMINE			9,345±9,573	2,373±1,620

[実施例 2 3] アルキル化直鎖スベルミンの *in vitro* 遺伝子導入

アルキル化直鎖スベルミンのヒト肝癌細胞 (Hep G2) に対する遺伝子発現を検討した。表中、数値は平均値 $\pm$ SD (n=3)を示す。化合物は T 化合物は TSL-D4、TSL-D8、TSL-D12、TSL-D16、PSL-D16 を用い、方法は実施例 12-16 に準じた。

結果を表 4 に示した。トランスフェクション時、血清無添加の場合、LipofectAMINE の遺伝子発現に比べて、TSL-D8、TSL-D16 は 10 倍以上、また、PSL-D16 は 5 倍以上高い値を示した。一方、血清添加では TSL-D16 は LipofectAMINE の 10 倍以上高い値であった。

表 4

化合物名	化合物 番号	電荷比 (eq)	遺伝子発現 LacZ (RLU/μg・sec)	
			No serum	50% Serum
TSL-D4	43	9	140±14	142±5
		18	479±570	2,517±2,361
TSL-D8	42	9	163,488±55,392	269±5
		18	141,151±111,159	291±9
TSL-D12	41	9	1,999±2,270	144±3
		18	10±14	132±8
TSL-D16	40	9	142,963±26,041	50,683±8,892
		18	17,435±12,412	23,393±10,319
PSL-D16	49	9	63,231±16,415	6,721±2,608
		18	563±412	2,702±383
LipofectAMINE			9,345±9,573	2,373±1,620

[実施例 2 4] ヒト膵臓癌細胞およびヒト神経膠芽腫細胞の調製

ヒト膵臓癌細胞 BxPc-3 (Primary pancreatic adenocarcinoma, 大日

本製薬株式会社より入手)を10%FBS(GIBCOBRL社製)を添加したRPMI培地(GIBCOBRL社製)で37°C、CO<sub>2</sub>培養器で培養した。同様にヒト神経膠芽腫SK-N-MC(Glioblastoma, ATCCより入手)を10%FBSを添加したD-MEM培地(GIBCOBRL社製)で37°C、CO<sub>2</sub>培養器で培養した。各々の細胞をtrypsin処理後、氷冷した各々の培地で3回洗浄後、 $1 \times 10^8$  cells/mlとなるよう調製した。マウス皮下への移植は調製後40分以内に行った。

#### [実施例25] 皮下移植担癌マウスの作製

SCIDマウス(雄、5週令、日本クレア株式会社)の脇腹左右の2ヶ所および背部上下の2ヶ所の計4ヶ所の皮下に実施例24で調製した癌細胞各々0.2mlを投与した(注射針29Gx1/2〃、テルモ株式会社)。投与2週後、生着したヒト膀胱癌細胞BxPc-3の腫瘍径は縦0.5-0.8cm、横0.5-0.8cmであった。一方、ヒト神経膠芽腫SK-N-MCの腫瘍径は縦0.9-1.4cm、横1.1-1.75cmであった。

#### [実施例26] プラスミドの調製法

クラゲの緑色蛋白質のGFP(Clontech社、pEGFP-N1)をプラスミドpCAGGSに挿入したプラスミドpCAG-EGFPを構築した。このプラスミドのストック溶液(8mgDNA/ml TE)を5%グルコース(扶桑薬品工業株式会社、ブドウ糖注射液)で希釈し500 $\mu$ g DNA/mlのDNA溶液を調製した。1 $\mu$ gDNAの負電荷モル数は3nmol、500 $\mu$ gDNAの負電荷モル数は500 $\mu$ g x 3 nmol = 1,500nmolとした。

#### [実施例27] 各種誘導体キャリアー溶液の調製法

N/P(N:キャリアーのニトロゲンの陽電荷モル数/P:DNAのリン酸を負電荷モル数の比)が0.3等量となるよう実施例21のストック溶液を

5%グルコースで調製した。

〔実施例 28〕 DNA 複合体の形成法

1.5ml エッペンドルフチューブに実施例 26 の DNA 溶液  $100\mu\text{l}$  を入れ、次いで実施例 27 のキャリアー溶液  $100\mu\text{l}$  を加えて軽くボルテックスで混合後、室温で 30 分以上放置し、DNA 複合体 ( $N/P=0.3$  等量) を形成させた。一夜、 $4^{\circ}\text{C}$  で放置後、以下の実験に供した。

〔実施例 29〕 皮下移植担癌マウスでの遺伝子発現

実施例 28 の DNA 複合体  $50\mu\text{l}$  ( $12.5\mu\text{gDNA}$ ) を実施例 25 の皮下移植担癌マウスの腫瘍内に直接投与した (注射針  $29\text{G}\times 1/2\text{''}$ 、テルモ株式会社)。DNA 複合体の投与 10 日後、マウスをエーテル麻酔下に頸椎脱臼屠殺し、生着した腫瘍を皮下から挟みで切り出した。GFP 遺伝子の発現は、腫瘍を切断し内部の腫瘍組織を蛍光顕微鏡で観察することで行った。結果は表 5 に示した。表中の GFP 発現強度において、(+) は強い発現、(±) は僅かな発現、(-) は発現なしを示す。ヒト膀胱癌細胞 BxPc-3 に対し、TSL-D8、TSL-D16、PSL-D16、TEL-D8、TEL-D16 が nakedDNA より強い GFP の蛍光が観察された。同様にヒト神経膠芽腫 SK-N-MC に対し、TEL-D8 が nakedDNA より強い GFP の蛍光が観察された。

表 5

化合物名	化合物 番号	マウス皮下腫瘍内遺伝子発現	
		BxPc-3	SK-N-MC
TEL-D8	27	++	±
TEL-D12	26	-	-
TEL-D16	25	++	±
TSL-D4	43	±	±
TSL-D8	42	++	++
TSL-D12	41	-	-
TSL-D16	40	++	±
PSL-D16	49	++	±
Naked DNA		±	- / ±

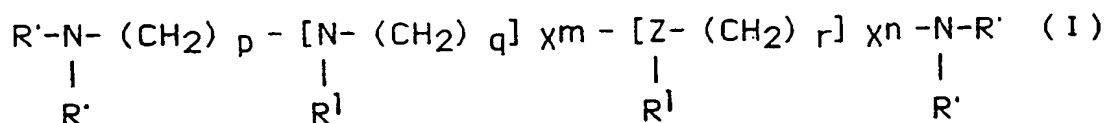
#### 産業上の利用の可能性

本発明により、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンを構成成分とする組成

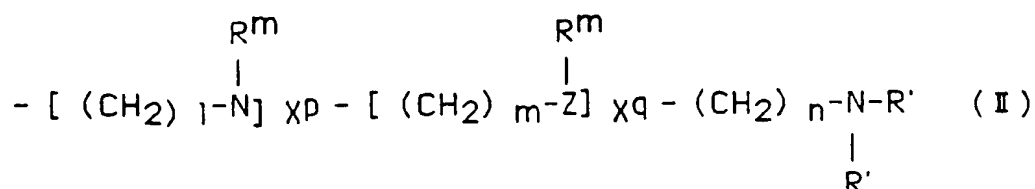
物、および該組成物を用いた遺伝子導入法が提供された。これにより、従来のカチオン性高分子に比し、より高い効率で、負電荷の生理活性物質を細胞内へ輸送することが可能となった。

## 請求の範囲

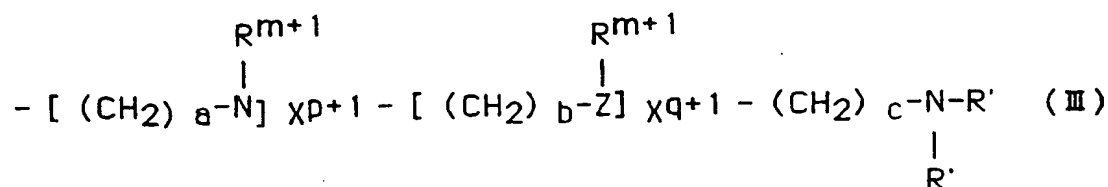
1. 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物。
2. 疎水基がコレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、またはリン脂質残基である、請求項1に記載の組成物。
3. 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンが下記構造式(I)で表される化合物である、請求項1に記載の組成物。



(式中、基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、側鎖R<sup>1</sup>は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式(II)を表す。また、式中、p、q、r、X<sup>n</sup>、X<sup>m</sup>は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖  $R^m$  にアミド結合が含まれていてもよく、 $Z$  は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 $R'$  は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの  $R'$  は同一であっても異なってもよく、 $R^m$  は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式 (III) を表す。また、式中、 $l$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $X^p$ 、 $X^q$  は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖  $R^{m+1}$  の基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、 $Z$  は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 $R'$  は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの  $R'$  は同一であっても異なってもよい。また、式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $X^{p+1}$ 、 $X^{q+1}$  は任意の自然数を表す。)

4. 基本骨格に次式 (IV) の繰り返し構造を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の組成物。





5. テトラエチレンペンタミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結した請求項4に記載の組成物。

6.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項5に記載の組成物。

7.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項5に記載の組成物。

8. 式(IV)を含む構造が分岐状に連結した請求項4に記載の組成物。

9.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項8に記載の組成物。

10.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項8に記載の組成物。

11. 基本骨格にスベルミン構造を含む、請求項1から3のいずれか

に記載の組成物。

12. スベルミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結した請求項11に記載の組成物。

13.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項11に記載の組成物。

14.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項11に記載の組成物。

15. スベルミン構造が分岐状に連結した請求項11に記載の組成物。

16.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項14に記載の組成物。

17.  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^m$ 、 $R^{m+1}$ の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項14に記載の組成物。

18. さらにリン脂質を含む、請求項1から17のいずれかに記載の組成物。

19. リン脂質が、中性リン脂質または酸性リン脂質である、請求項18に記載の組成物。

20. リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン骨格またはホスファチジルコリン骨格を有する、請求項19に記載の組成物。

21. リン脂質が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンである、請求項20に記載の組成物。

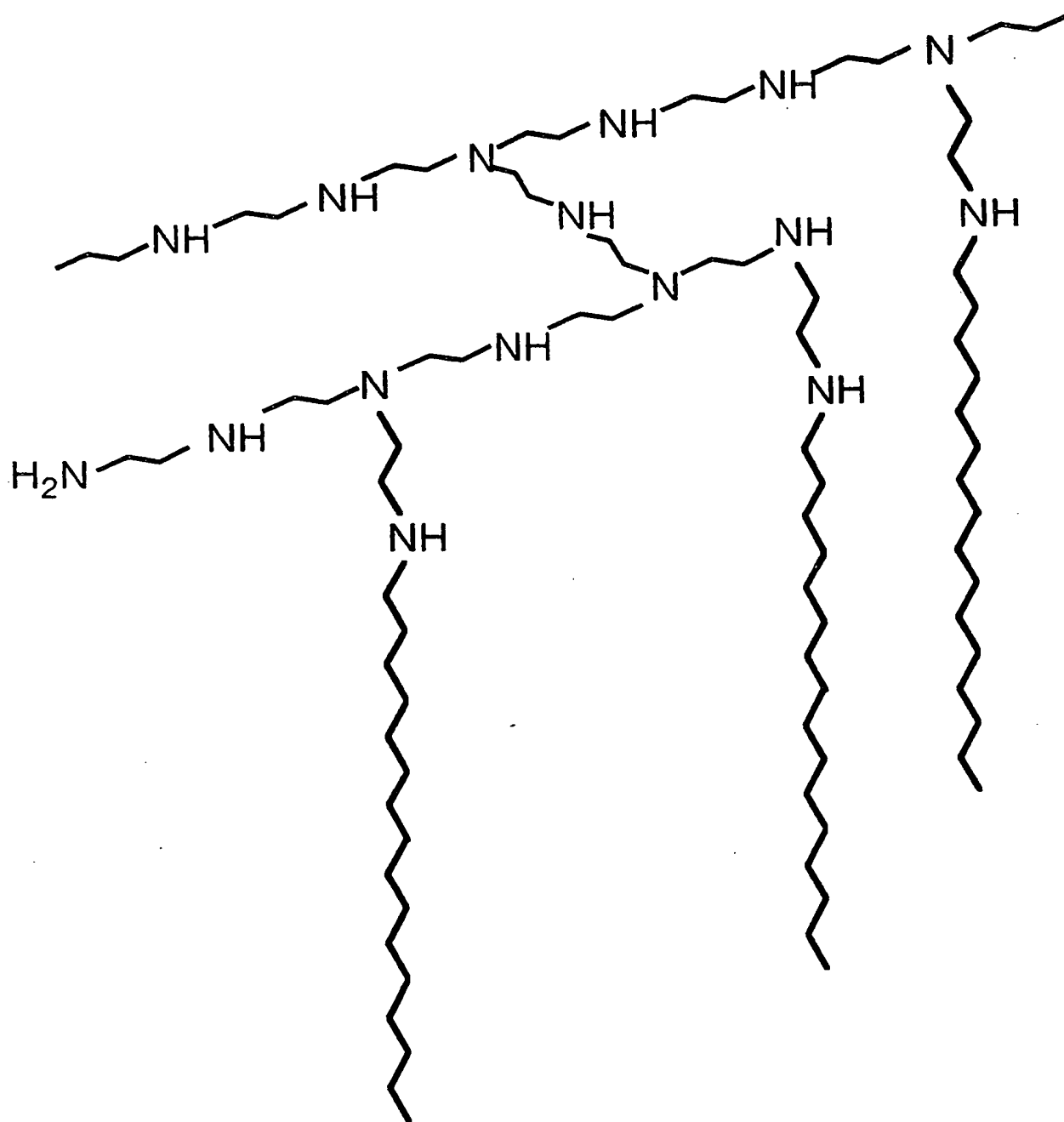
22. 負電荷を有する生理活性物質と、請求項1から21のいずれかに記載の組成物を含む複合体。

23. 負電荷を有する生理活性物質が、核酸またはその誘導体である、請求項22に記載の組成物を含む複合体。

24. 請求項22または23に記載の複合体を細胞に接触させる工程を含む、負電荷を有する生理活性物質を細胞内へ導入する方法。

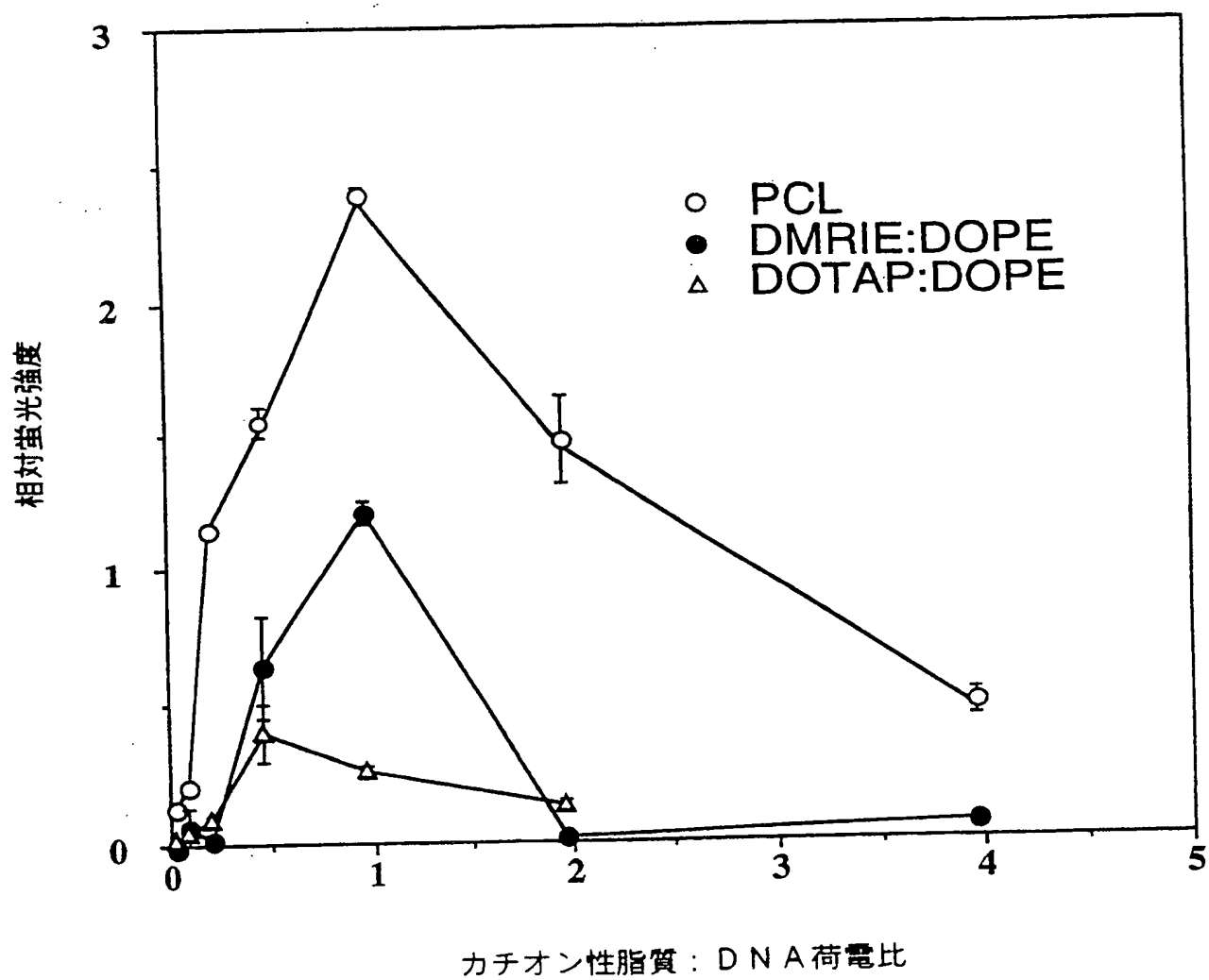
25. 請求項19から21のいずれかに記載の組成物を製造するための、リン脂質および疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキット。

図 1



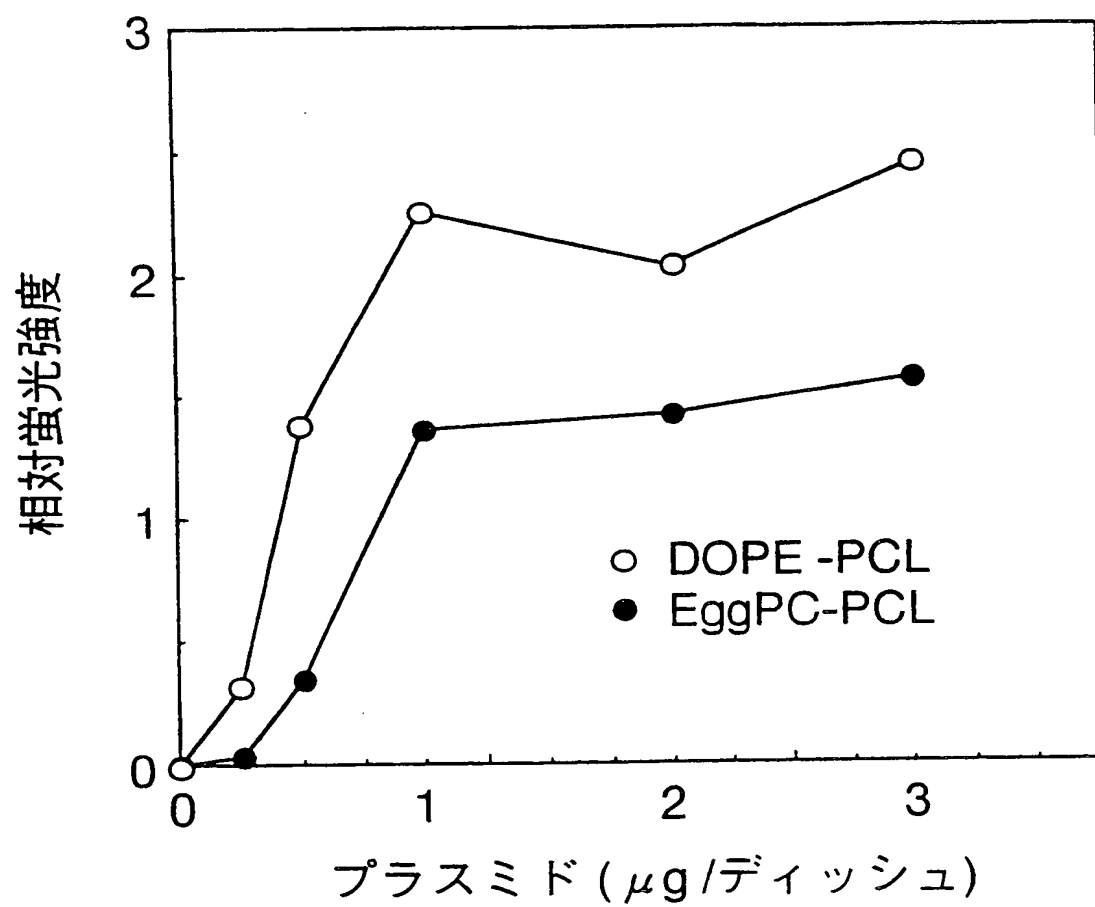
2 / 16

図 2



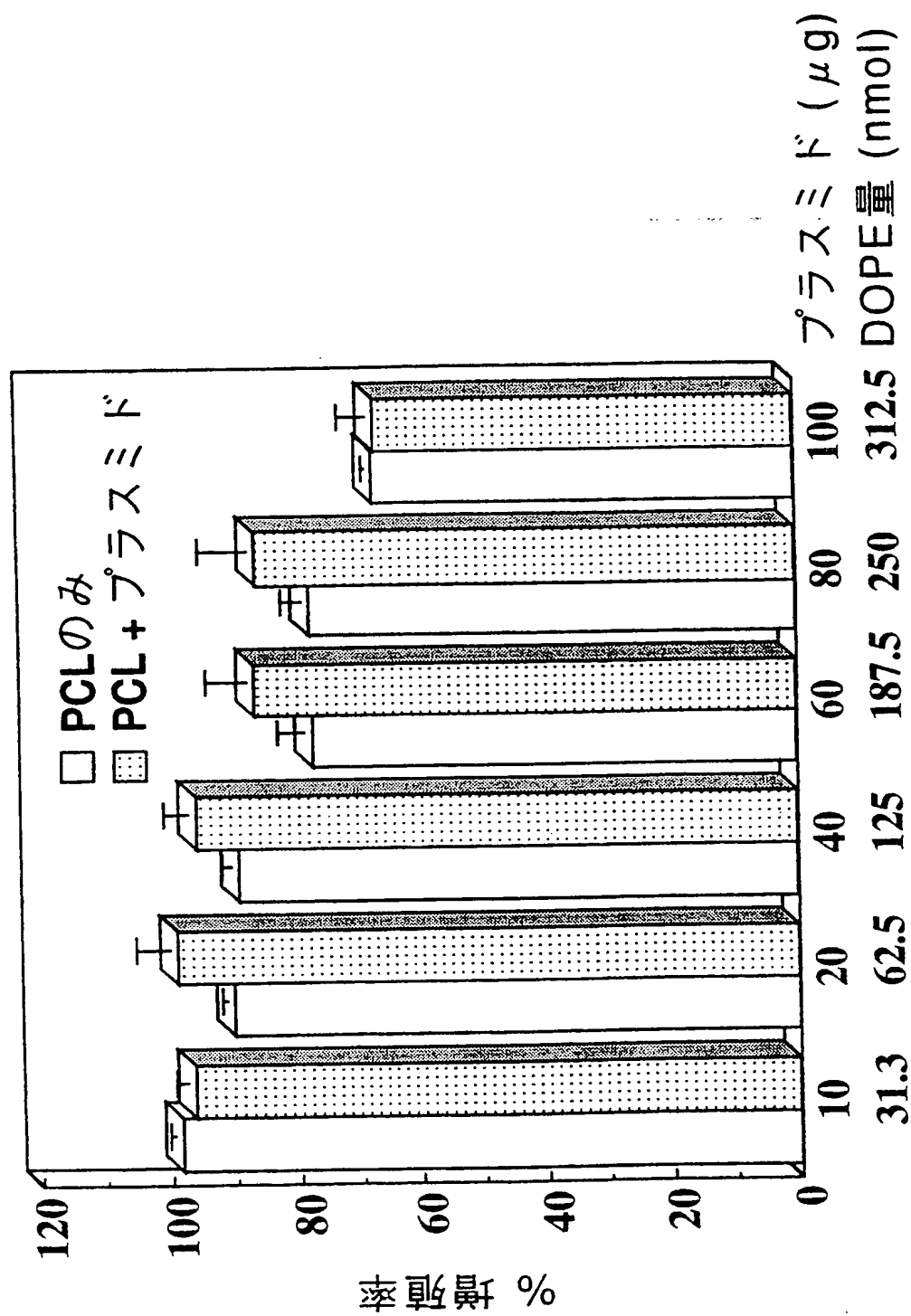
3 / 16

図 3



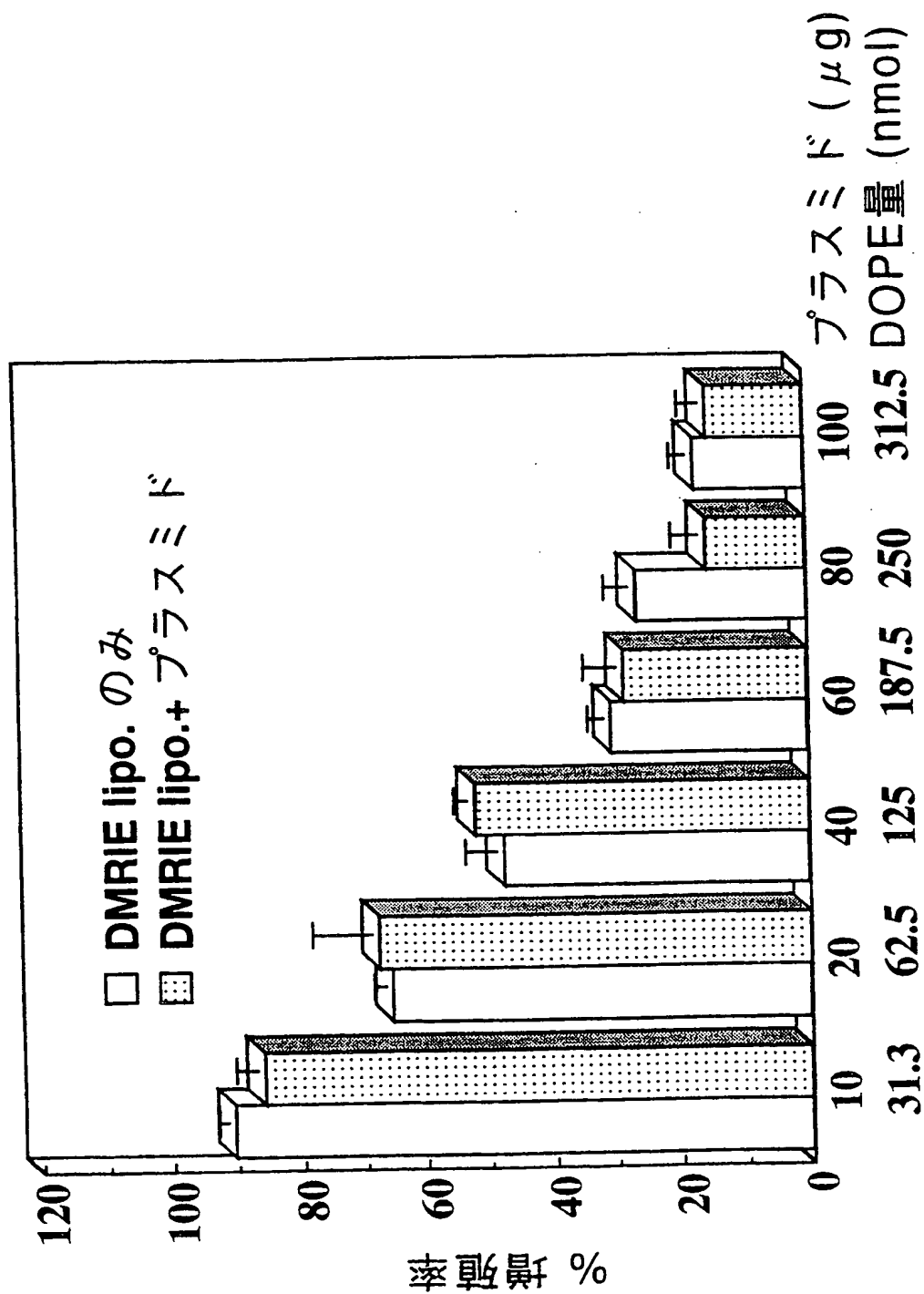
4 / 16

図 4



5 / 16

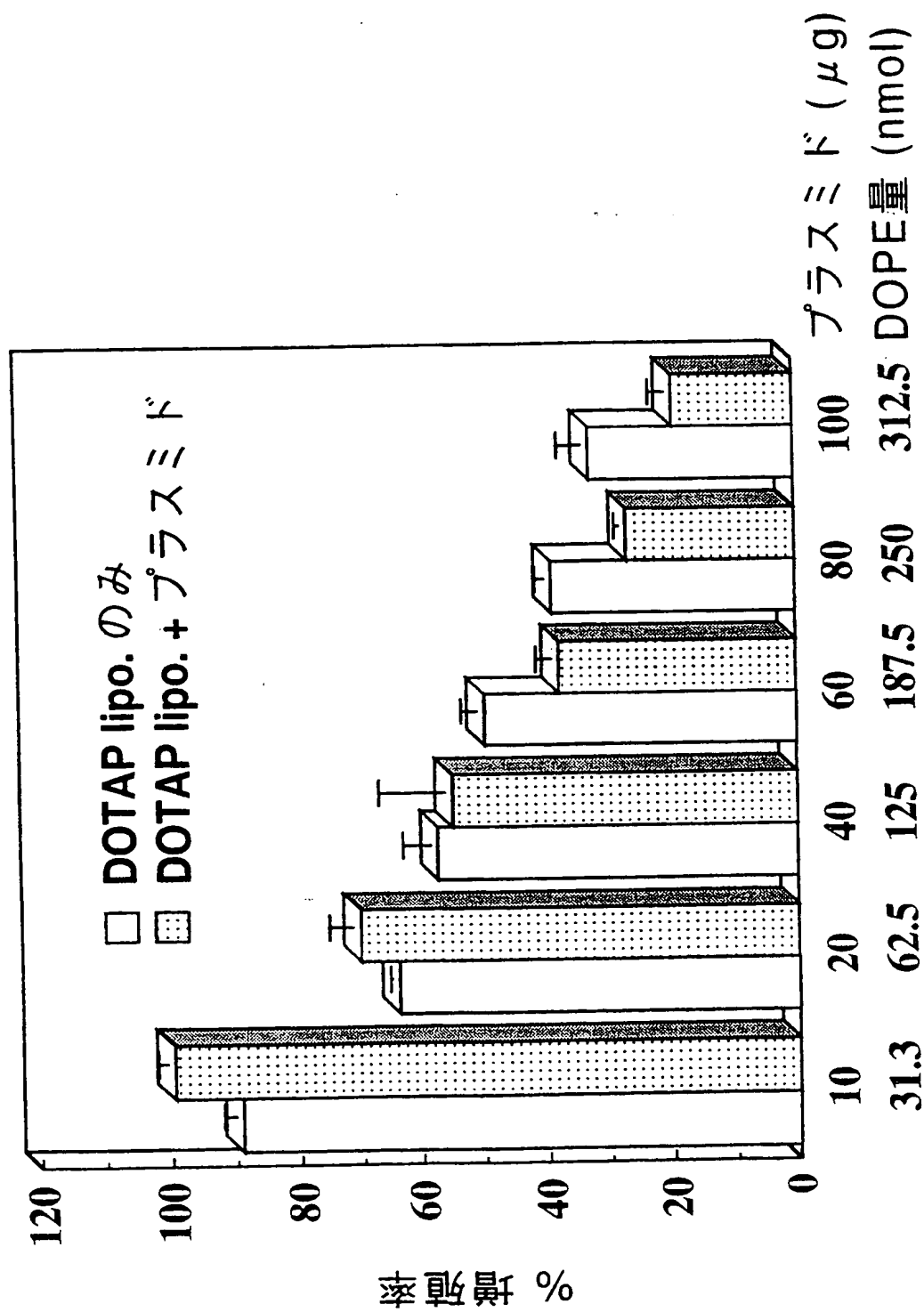
図 5





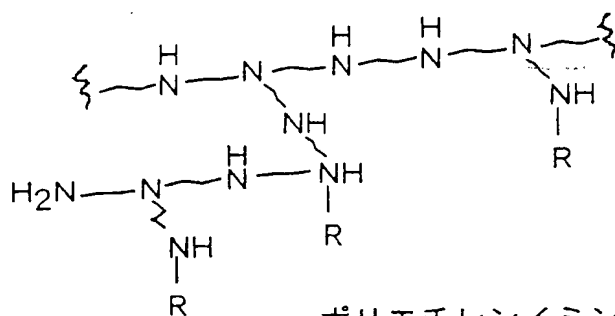
6 / 16

図 6



7 / 16

図 7

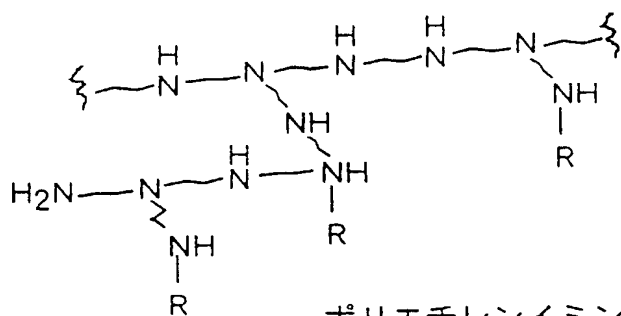


ポリエチレンイミン  
MW 約600

化合物名	化合物 番号	R	アルキル導入率 mol%
P6	1	H	0
P6D20.3	2	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> (Decyl)	20.3
P6L18.4	3	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (Lauryl)	18.4
P6M18.8	4	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> (Myristyl)	18.8
P6C17.5	5	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)	17.5
P6C24.5	6	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)	24.5
P6S21.2	7	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> (Stearyl)	21.2
P6S11.3	8	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> (Stearyl)	11.3

8 / 16

図 8

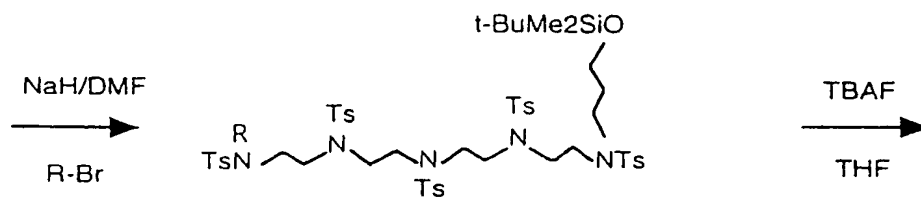
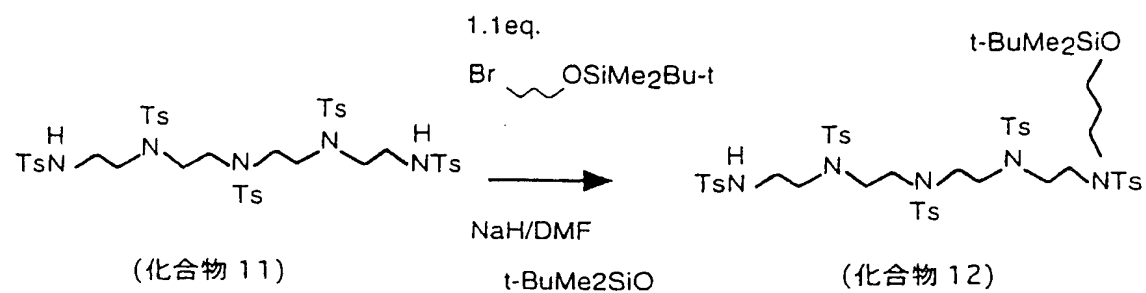
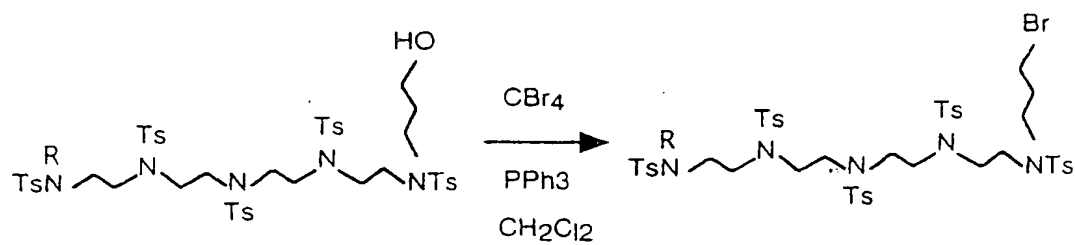


ポリエチレンイミン  
MW 約1,800

化合物名	化合物 番号	R	アルキル導入率 mol%
P18		H	0
P18C12.3	9	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)	12.3
P18C20.6	10	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)	20.6

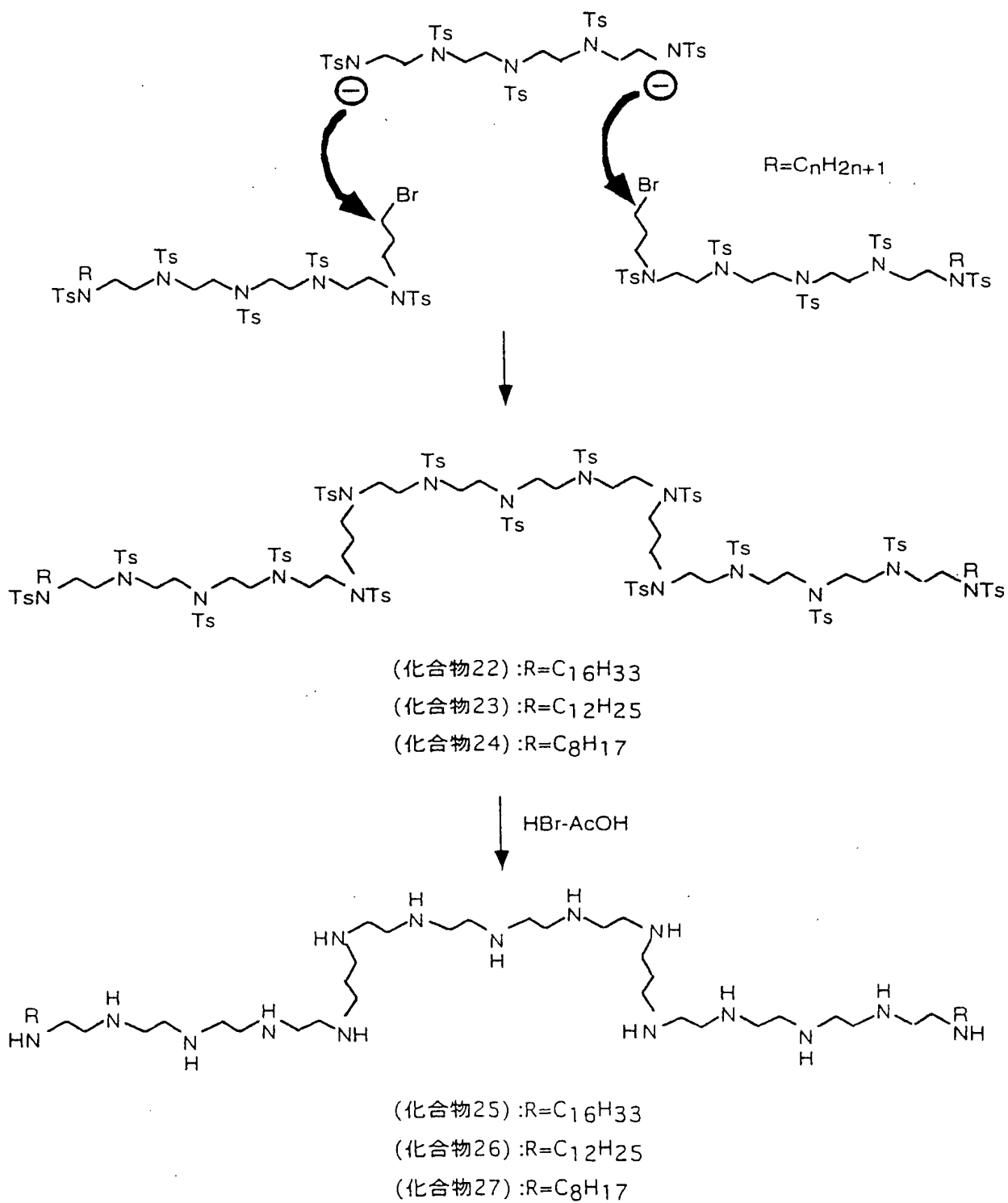
9 / 16

図 9

(化合物13): R=C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>(化合物14): R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>(化合物15): R=C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>(化合物16): R=C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>(化合物17): R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>(化合物18): R=C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>(化合物19): R=C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>(化合物20): R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>(化合物21): R=C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>

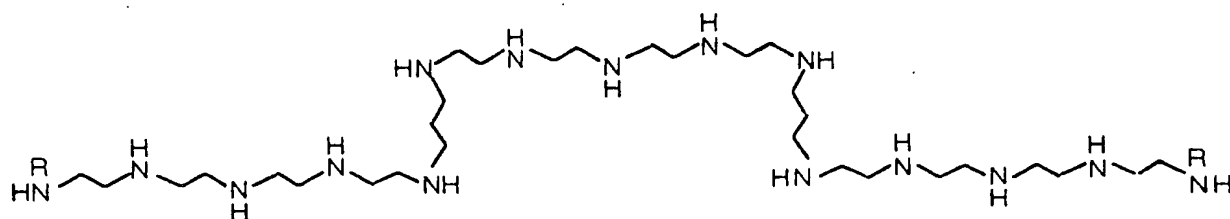
10 / 16

図 10



11 / 16

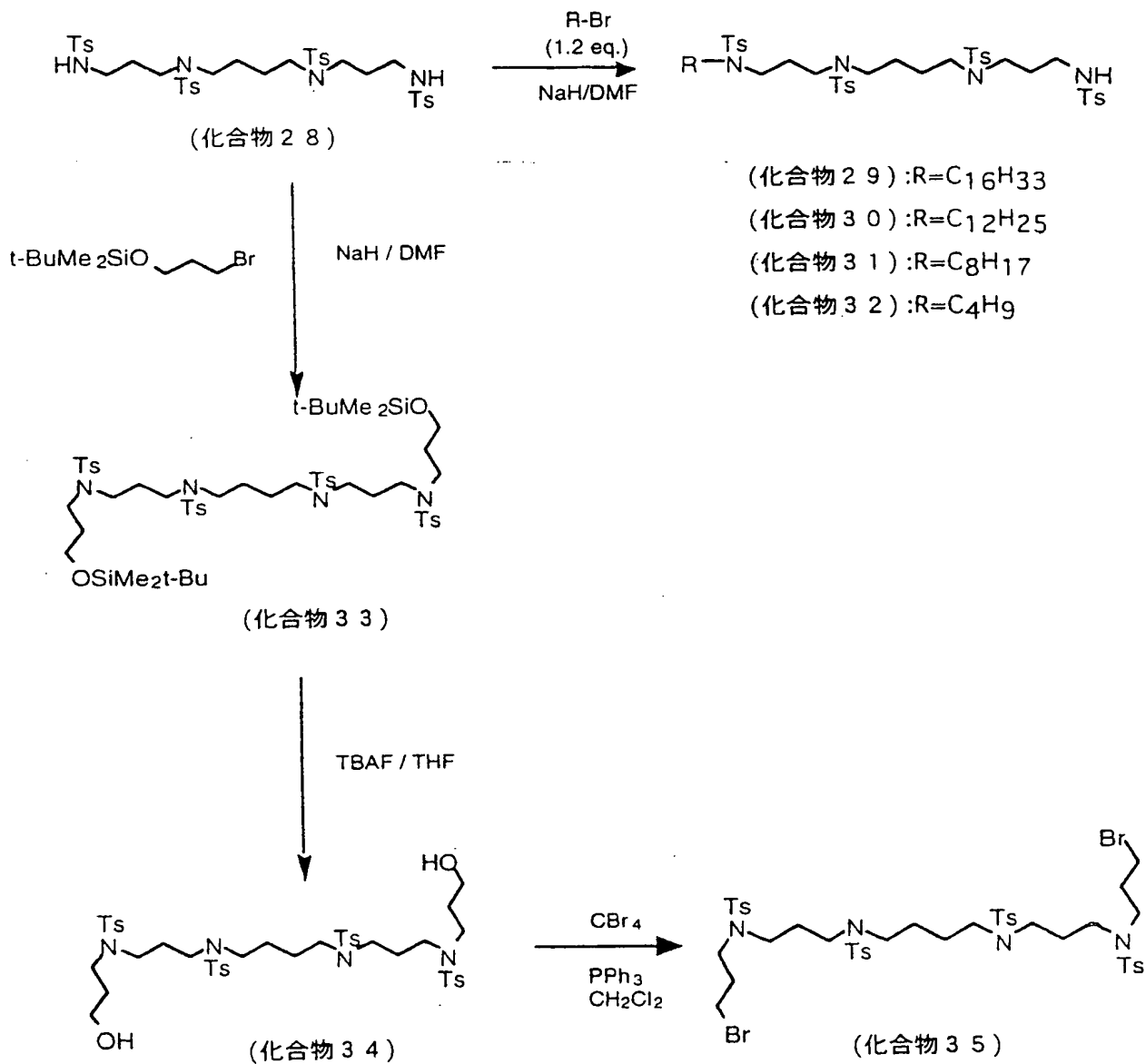
図 11



化合物名	化合物番号	R
TEL-D16	25	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)
TEL-D12	26	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (Lauryl)
TEL-D8	27	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> (Octyl)

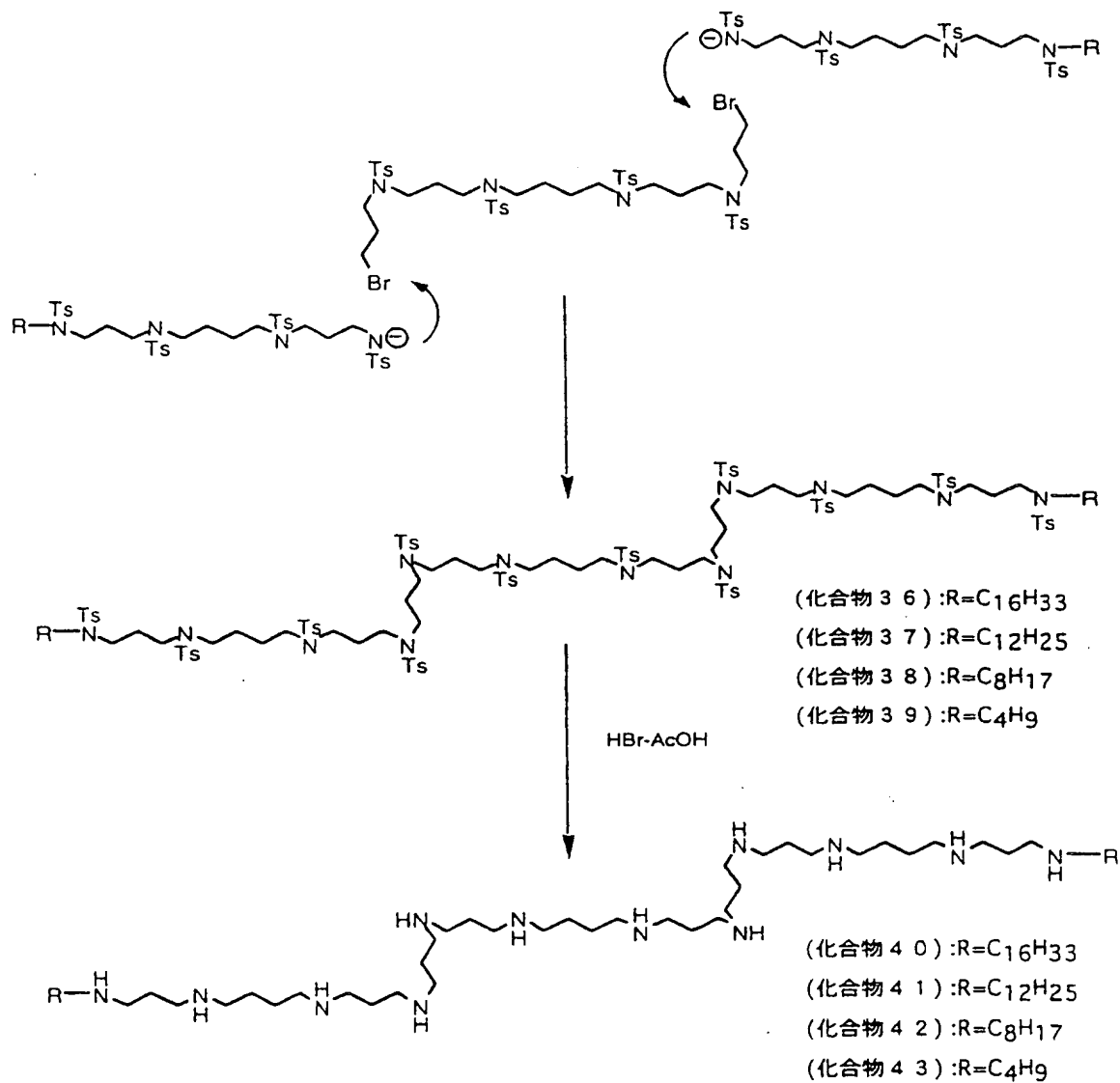
12 / 16

図 12



13 / 16

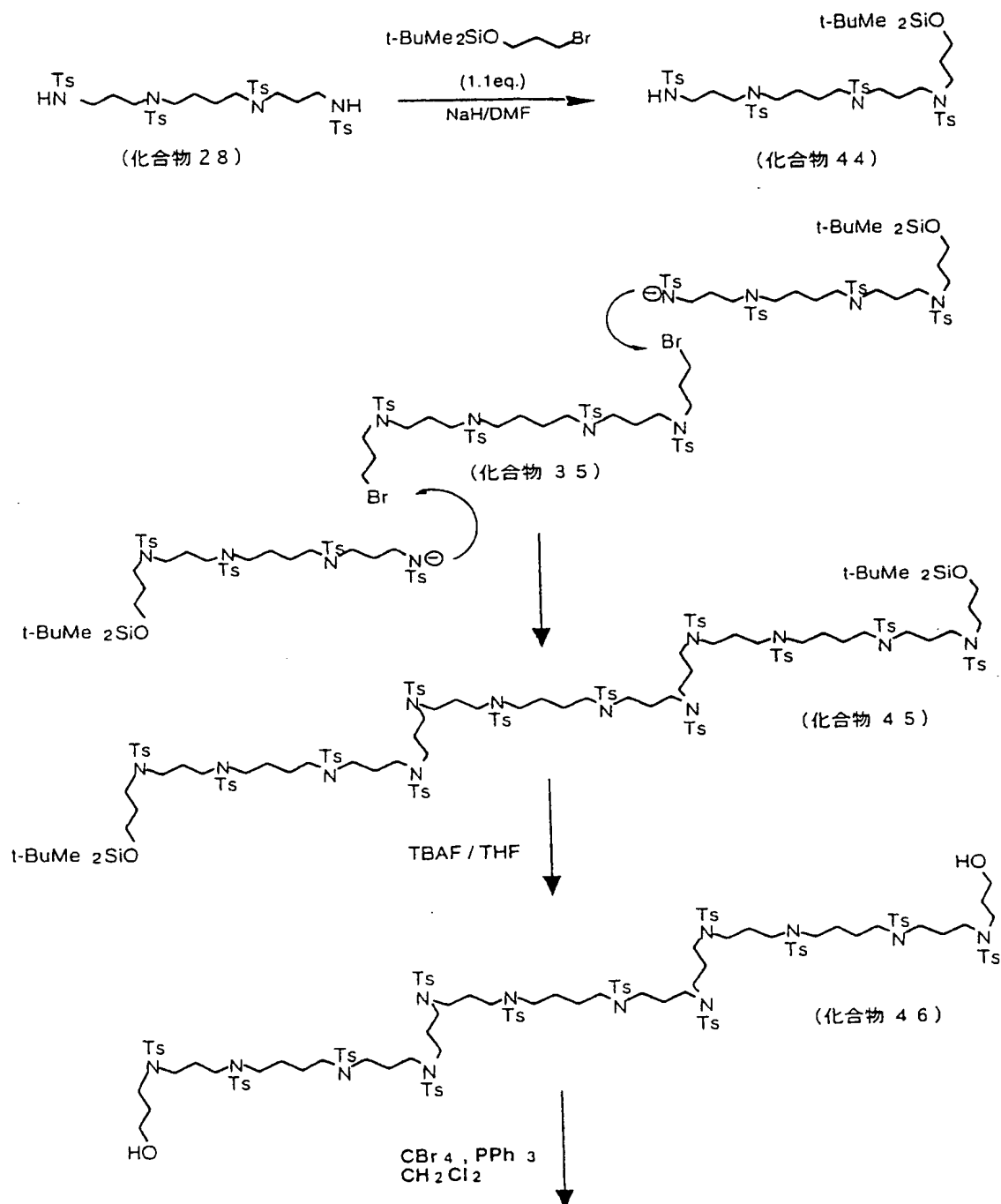
図 13





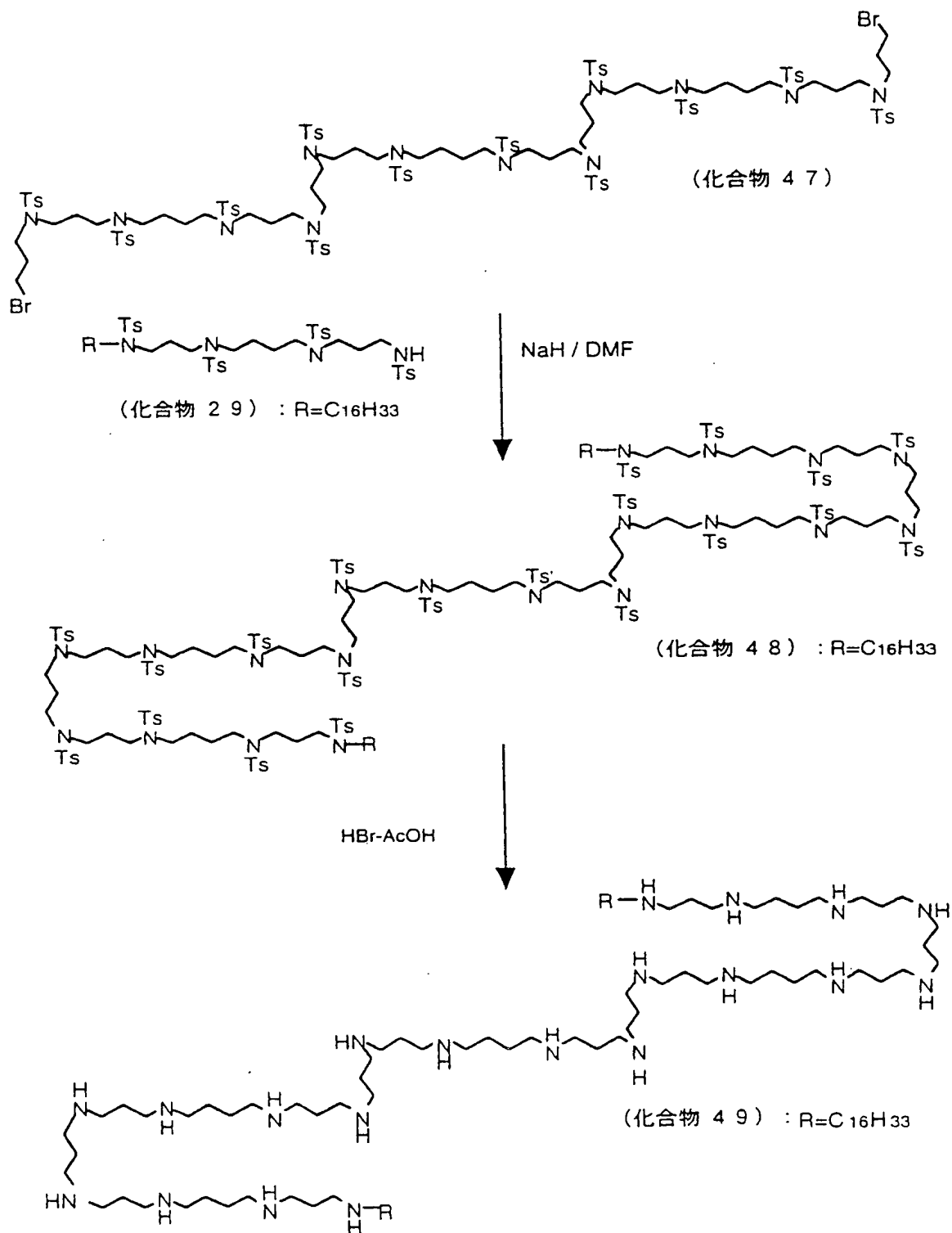
14 / 16

図 14



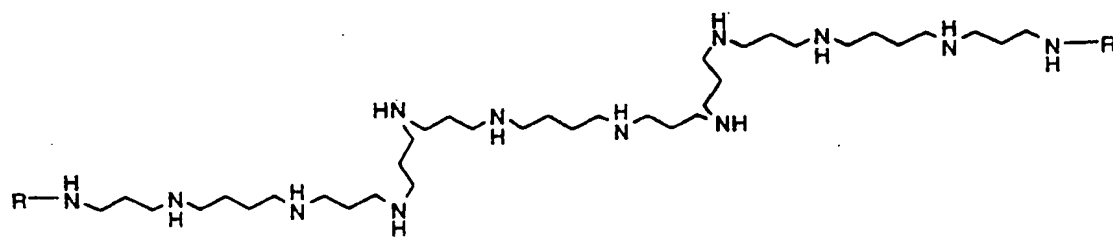
15 / 16

図 15

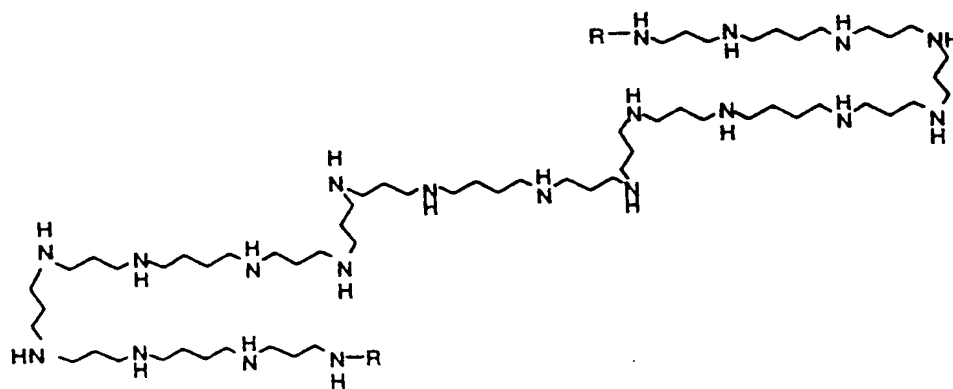


16 / 16

図 16



化合物名	化合物番号	R
TSL-D16	40	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)
TSL-D12	41	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (Lauryl)
TSL-D8	42	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> (Octyl)
TSL-D4	43	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> (Butyl)



化合物名	化合物番号	R
PSL-D16	49	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (Cetyl)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP99/00954

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48 // C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48 // C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	KHMELNITSKY, Y.L., et al., "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p.737-745	1-2 3-17 18-25
A	ZANTA, M.A., et al., "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p.839-844	1-25
Y A	JP, 43-8828, B (The Dow Chemical Co.), 8 April, 1968 (08. 04. 68) (Family: none)	3-17 1-2, 18-25
Y A	JP, 52-10400, A (Institut Neftekhimicheskogo Sinteza Imeni A.V. Toncheva Akademii Nauk SSSR), 26 January, 1977 (26. 01. 77) & GB, 1459809, A & DE, 2530042, A & US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
20 April, 1999 (20. 04. 99)Date of mailing of the international search report  
11 May, 1999 (11. 05. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/00954

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP, 59-86626, A (Institut Neftekhimicheskogo Sinteza Imeni A.V. Toncheva Akademii Nauk SSSR), 18 May, 1984 (18. 05. 84) & DE, 3237663, A & GB, 2128625, A & US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/00954

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C 08 L 79/02, A 61 K 45/00, A 61 K 48/00, A 61 K 47/48//  
C 12 N 15/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C 08 L 79/02, A 61 K 45/00, A 61 K 48/00, A 61 K 47/48//  
C 12 N 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN)、MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	KHMEINITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745	1 - 2 3 - 17 18 - 25
A	ZANTA, M. A., et al. "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p. 839-844	1 - 25
Y A	J P, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー), 8. 4月. 1968 (08. 04. 68) (ファミリーなし)	3 - 17 1 - 2, 18 - 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4 J

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 6833

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP, 52-10400, A (インスティテュート ネフテキミチ エスコゴ シンテザ イメニ エイ. ヴィ. トプチュヴァ アカデ ミイ ナウク エスエスエスアール), 26. 1月. 1977 (2 6. 01. 77) & GB, 1459809, A&DE, 25300 42, A&US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25
Y A	JP, 59-86626, A (インステイチュト・ネフテヒミチエ スコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデミー ・ナウク・エスエスエスアール), 18. 5月. 1984 (18. 05. 84) & DE, 3237663, A&GB, 212862 5, A&US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25